



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**INTERVENCIÓN DIETÉTICA EN LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Repercusiones analíticas y clínicas

Daniel Alejandro García Gañán

2021

D^a ANA PURIFICACIÓN VELASCO CRIADO, Profesora Titular de Universidad, adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

AUTORIZA

La presentación de la Tesis Doctoral: “Intervención dietética en la esclerosis múltiple – Repercusiones analíticas y clínicas”, realizada bajo su dirección por el Licenciado en CC. Químicas y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Graduado en Nutrición Humana y Dietética D. Daniel Alejandro García Gañán en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman el documento en Salamanca a 14 de junio de 2021.

Fdo. Ana Purificación Velasco Criado

**ILMO. SR. DIRECTOR DEL INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA LEÓN DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Ana Velasco Criado, todo el tiempo y dedicación durante estos años. Ha sido un camino largo y complejo, con un largo trabajo de campo y una laboriosa escritura de esta Tesis, y no sólo ha aportado todo su conocimiento para sortear los obstáculos, sino que ha sido realmente paciente y comprensiva todo este tiempo. Sus observaciones, consejos, y correcciones han sido tan valiosas como necesarias para llegar al presente texto.

Quiero también expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Yasmina Berdei Montero, responsable de la consulta de Esclerosis Múltiple del Hospital Clínico Universitario de Salamanca porque, sin ella, es de justicia reconocerlo, esta Tesis no hubiese podido realizarse. Suyo es el mérito del reclutamiento de pacientes y de la gestión de las analíticas, por no mencionar su paciente labor de transmitirme un poco de su inmenso conocimiento sobre la esclerosis múltiple y su constante disposición a ayudar a lo largo de estos años. Y a Marta Fiz Santelesforo, enfermera de la consulta de esclerosis múltiple, por su disposición para la extracción de las muestras siempre que fue necesario.

No puedo olvidarme del Dr. José Carlos Gómez, que me dio su apoyo para que este proyecto echase a andar. Gracias José Carlos. Y quiero agradecer a la Dra. Aránzazu Taberero y a todo el personal del INCYL su ayuda y soporte para que este trabajo haya salido adelante.

Por último, el mayor agradecimiento a los pacientes que han participado en el estudio. Ha sido un placer trabajar con ellos durante estos años en los que mostraron siempre su entusiasmo y ganas de ayudar a que se aporte un granito de arena de conocimiento sobre la enfermedad que padecen.

Va por ti, Sami

Índice

1. Antecedentes	12
1.1. Hábitos dietéticos: influencia en la evolución y pronóstico de pacientes con EM	15
1.1.1. Impacto de la alimentación sobre el curso de las enfermedades inflamatorias	16
1.2. Influencia de la vitamina D en la evolución y pronóstico de pacientes con EM	20
1.2.1. Relación metabólica y epidemiológica entre vitamina D y EM	20
1.2.2. Sinergia entre vitamina D y estrógenos para la regulación de células T autoinmunes y prevención de la desmielinización	23
1.3. Influencia de la vitamina B12 en la evolución y pronóstico de pacientes con EM	26
1.3.1. Fisiología de la vitamina B12	26
1.3.2. Problemas neurológicos asociados con la vitamina B12	26
1.3.3. Metabolismo de la vitamina B12	26
1.3.4. Efectos inmunorreguladores de la vitamina B12	28
1.3.5. Papel del estrés oxidativo en la neurodegeneración	28
1.4. Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados dietéticos en la evolución y pronóstico de pacientes con EM	28
1.4.1. Mecanismos de acción	29
1.4.2. PUFAs omega-3 y mielina	30
1.5. Influencia de los niveles de homocisteína plasmática en la evolución y pronóstico de pacientes con EM	30
1.5.1. Homocisteína: definición y metabolismo	30
1.5.2. El ciclo de la homocisteína	33
1.5.3. El ciclo del folato	36

1.5.4.	Impacto del ciclo de la homocisteína en la regulación epigenética	38
1.5.5.	Modificaciones epigenéticas dependientes de metilación	38
1.5.6.	Metilación de histonas	40
1.5.7.	Metilación de DNA	40
1.5.8.	Impacto de alteraciones en el ciclo de un carbono e hiperhomocisteinemia sobre algunas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas	44
1.5.9.	Interacciones entre la homocisteína, el ciclo de metilación y los mecanismos fisiopatológicos en EM	44
2.	Hipótesis y Objetivos	47
3.	Materiales y Métodos	49
3.1.	Reclutamiento de pacientes y controles	49
3.2.	Consultas de nutrición	49
3.3.	Dietas implementadas	50
3.4.	Mediciones, analíticas y software	57
3.5.	Evaluación de la EDSS	57
3.6.	Líneas de tratamiento	57
3.6.1.	Primera línea	57
3.6.2.	Segunda línea	58
3.6.3.	Criterios de cambio de línea de tratamiento	59
3.7.	Escala de frecuencia de consumo de alimentos	60
3.8.	Escala de seguimiento / adherencia a la dieta	62
4.	Resultados	63
4.1.	Descripción de la muestra de pacientes y controles	63
4.1.1.	Edades y tamaño de la muestra de pacientes	63
4.1.2.	IMC	65

4.1.3.	EDSS	66
4.1.4.	Líneas de tratamiento	67
4.1.5.	Hábitos dietéticos de la muestra de pacientes	67
4.1.6.	Consumo de verduras	69
4.1.7.	Consumo de alimentos proteicos	70
4.1.8.	Consumo de alimentos no recomendables	71
4.1.9.	Parámetros bioquímicos basales de la muestra de pacientes	72
-	Homocisteína	72
-	Colesterol	73
-	Ácido fólico	74
-	Vitamina D	76
-	Hierro	77
-	Glucosa	78
-	Albúmina	79
-	Otros parámetros	81
4.1.10.	Datos de los controles	83
4.2.	Resultados derivados de valores basales	84
4.2.1.	Homocisteína de pacientes vs grupo de control	84
4.2.2.	Correlación entre homocisteína e IMC en pacientes	85
4.2.3.	Correlación entre glucosa e IMC en pacientes	86
4.2.4.	Correlación entre ácido fólico e IMC en pacientes	87
4.2.5.	Correlación entre homocisteína y consumo de verdura en pacientes	88
4.2.6.	Correlación entre homocisteína y consumo de alimentos proteicos y alimentos no recomendables	90
4.2.7.	Relación entre hábitos dietéticos y línea de tratamiento	90
4.2.8.	Niveles de diferentes parámetros bioquímicos en función de la línea de tratamiento	92
4.3.	Resultados longitudinales	94
4.3.1.	Variación total del IMC a lo largo del estudio	94

4.3.2.	Variación de la homocisteína según el seguimiento de la dieta	95
4.3.3.	Variación total de los niveles de glucosa	99
4.3.4.	Variación total de la creatinina	99
4.3.5.	Variación total del colesterol	100
4.3.6.	Variación de las proteínas totales y de la albúmina	101
4.3.7.	Variación de los niveles de hierro, ferritina y Transferrina	102
4.3.8.	Variación de los niveles de vitamina B12, vitamina D y ácido fólico	103
4.3.9.	Variación de parámetros bioquímicos en función de la línea de tratamiento	104
-	Variación de los niveles de homocisteína en cada línea de tratamiento	104
-	Variación de los niveles de glucosa, colesterol y creatinina en cada línea de tratamiento	105
-	Variación de los niveles de ácido fólico, vitamina B12, hierro y proteínas totales en cada línea de tratamiento	107
4.3.10.	Variación de hábitos dietéticos durante el estudio	110
4.3.11.	Evolución de la EDSS durante el estudio	112
-	Evolución general de la EDSS	112
-	Variación de la EDSS en función del grado de seguimiento total a lo largo del año de estudio	112
5.	Discusión	116
5.1.	Homocisteína	116
5.2.	Colesterol	118
5.3.	Ácido fólico	118
5.4.	Albúmina	119
5.5.	Evolución de la EDSS	120

5.6.	Índice de Masa Corporal y EM	120
5.7.	Hábitos dietéticos y línea de tratamiento	122
5.8.	Valores analíticos y líneas de tratamiento	124
5.9.	Evolución de la adherencia a la dieta	125
6.	Conclusiones	125
7.	Bibliografía	128

Resumen

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, crónica y neurodegenerativa del sistema nervioso central. Se trata de la enfermedad neurodegenerativa más prevalente en nuestro entorno y afecta principalmente a adultos jóvenes, sobre todo mujeres. Desde que se demostrara la relación entre la vitamina D y el riesgo y pronóstico de la enfermedad, se han realizado diversos estudios con el fin de establecer el posible papel de otros componentes de la dieta en el riesgo y pronóstico de la enfermedad. Todavía no se cuenta con estudios lo suficientemente amplios y las evidencias hasta la fecha no son concluyentes, pero resultados previos sugieren que otras moléculas dietéticas, como los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 DHA y EPA, la vitamina B12, la vitamina B6, el folato, así como diversos polifenoles, podrían tener cierta importancia a la hora de establecer unas pautas dietéticas en estos pacientes.

En los últimos años también se ha puesto el foco en la homocisteína, cuyos niveles parecen ser más elevados en pacientes con EM, aunque los mecanismos por los que se da este hecho están aún por dilucidar. Determinar si la homocisteína es más elevada en estos pacientes es uno de los objetivos de este trabajo. Este aumento podría afectar negativamente al curso de la enfermedad tanto por su carácter neurotóxico como por implicar que los niveles de metionina circulantes sean menores lo que a su vez perjudicaría a los procesos de remielinización.

Asimismo, las dietas hipocalóricas bajas en grasas de origen animal podrían suponer cierta neuroprotección al inhibir la actividad inflamatoria y el estrés oxidativo asociado.

Las evidencias actuales no permiten todavía establecer aun unas pautas dietéticas concretas pero este estudio establecerá unos criterios sobre los que basar la nutrición de estos pacientes.

1. Antecedentes

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad autoinmune inflamatoria y degenerativa del sistema nervioso central más prevalente en nuestro medio. Aunque es de etiología desconocida, se considera que probablemente sea desencadenada por un agente ambiental en un individuo susceptible genéticamente. Dentro de los factores desencadenantes propuestos se encuentran los hábitos dietéticos y el tabaquismo entre otros (envenenamiento con metales pesados, infecciones víricas, exposición a la luz solar y nivel de vitamina D, etc.) (Riccio et al, 2016). La enfermedad se caracteriza por procesos inflamatorios perivasculares diseminados y heterogéneos en la barrera hematoencefálica con participación de células T, linfocitos B, macrófagos y células microgliales contra el cerebro y la médula espinal (Riccio y Rossano, 2015). Se aprecian, por tanto, lesiones focales en la sustancia blanca, denominadas placas, en las que lo más llamativo es la pérdida de mielina (desmielinización) con preservación relativa de los axones, pues siempre está presente un grado variable de destrucción axonal (Fernández et al., 2011). Estas lesiones suelen ser múltiples, están distribuidas por todo el sistema nervioso central (SNC), su tamaño es variable, por lo general no mayor de 1,5 cm de diámetro, y tienden a coalescer, dando como resultado placas de mayor tamaño. Pueden aparecer placas de desmielinización en la sustancia gris, pero son más difíciles de identificar. Las neuronas también pueden estar afectadas en estas lesiones (Nosewothy et al., 2000).

Desde el punto de vista clínico, hay al menos dos formas principales de enfermedad: la EM remitente-recurrente (EMRR, aproximadamente un 85% de los casos) y la EM progresiva primaria (EMPP, un 15% de los casos). En EMRR, que normalmente evoluciona a progresiva secundaria, los brotes están asociados con un aumento de la inflamación sistémica y la formación de lesiones cerebrales seguidas de remisiones más o menos completas, mientras que la patogénesis de EMPP se caracteriza por daños neurológicos progresivos en vez de brotes y remisiones (Riccio y Rossano, 2015). Tras 10 años, un 50% de los pacientes pasa del curso en brotes a un curso progresivo (forma secundariamente progresiva o EMSP). Un 10% de los pacientes muestra un curso

progresivo desde el comienzo (forma primariamente progresiva o EMPP) (Fernández et al, 2011).

Existe una estrecha relación entre la nutrición y la enfermedad neurológica. El sistema nervioso precisa un aporte suficiente de macronutrientes y micronutrientes para que su funcionamiento sea óptimo. De hecho, la mayoría de las deficiencias de vitaminas u oligoelementos presentan manifestaciones neurológicas. En la actualidad, son muchos los estudios dirigidos a estudiar el posible papel de la dieta o de determinados nutrientes en la función cognitiva o en la prevención del deterioro asociado a la edad. También se está evaluando su influencia en el desarrollo o la evolución de determinadas enfermedades como la EM. La mayoría de los estudios clínico-nutricionales realizados hasta hace pocos años se han centrado en el estudio de la EM como enfermedad inflamatoria autoinmune (y menos como enfermedad neurodegenerativa). Así, son numerosos los estudios que han evaluado la relación entre la vitamina D y otros micronutrientes con la EM, encontrando que la deficiencia de vitamina D es frecuente en EM. También se han evaluado otros nutrientes como vitamina B12, selenio o vitamina E, pero los resultados aún no permiten establecer una recomendación concreta de suplementación. Se han realizado también estudios de suplementación con ácidos grasos omega-3 y omega-6 pero los resultados obtenidos son poco concluyentes (Riccio y Rossano, 2015).

Cabe aventurar que la interacción entre genética y factores ambientales podría desencadenar el proceso inflamatorio. Además, se ha observado hiperhomocisteinemia en pacientes de EM, pero parece que esto no está relacionado con la activación inmune, el estrés oxidativo o con una deficiencia de vitamina B6, B12 o folato, lo que indica que la hiperhomocisteinemia tiene un papel en la patogénesis de la EM.

La hipótesis de que la dieta podría influir sobre la incidencia y el pronóstico de la EM proviene de los resultados de estudios epidemiológicos que mostraban un aumento de la prevalencia de EM en poblaciones con altas ingestas de grasas saturadas y bajas de vitamina D. Sin embargo, a pesar de estos resultados, los ensayos clínicos controlados no han conseguido llegar a resultados concluyentes (Ebers, 2008). También se especula con la posibilidad de que, dada la mayor prevalencia de la enfermedad en los países occidentales por encima de los 40º de latitud, la mayor incidencia se deba a las dietas

típicamente hipercalóricas de esos países (Esposito, 2017). En cualquier caso, no hay una prueba definitiva de que la dieta pueda influir en la prevalencia de la enfermedad.

Los problemas metodológicos complican la investigación sobre la correlación entre dieta y EM. Hay sólo unos pocos estudios prospectivos disponibles y, la mayoría de la evidencia deriva de casos-control y estudios epidemiológicos de poblaciones determinadas. Estos últimos muestran una amplia variedad de asociaciones entre dieta y EM (Schwarz 2005).

El eje principal de este trabajo es el estudio de la homocisteína en los pacientes con EM y la variación que se pueda llevar a cabo con la dieta. Estudiar la homocisteína supone el conocimiento y calificación de los hábitos nutricionales, así como de las vitaminas implicadas en el ciclo de eliminación de la homocisteína, como son el ácido fólico y la vitamina B12. Para determinar si existe una correlación entre índice de masa muscular (IMC) y los niveles de homocisteína, debemos hacer un seguimiento del peso corporal, además de reducir los niveles de homocisteína. En este estudio se introducen cambios en la dieta de los pacientes que podrían suponer variaciones de peso incluso cuando este no fuese el objetivo, por lo que su monitorización es necesaria. Y estos cambios dietéticos también podrían a su vez, producir cambios en otros parámetros bioquímicos, como es el caso del colesterol, la glucosa, los niveles de hierro, ferritina y transferrina, niveles de albúmina, creatinina y proteínas totales. La variación, si la hubiera, de estos parámetros a lo largo del estudio y las diferencias en función de la línea de tratamiento, así como de otros determinantes a analizar, como las características de la dieta del paciente previa al estudio y su grado de adherencia a la dieta, marcaron los parámetros a medir y analizar. Y siempre monitorizando la evolución, en términos de EDSS, de los pacientes.

1.1. Hábitos dietéticos: influencia en la evolución y pronóstico de pacientes con EM

La EM es una enfermedad compleja y la genética y el factor inmunológico no parecen ser suficientes para explicar su origen. De hecho, toda la literatura revisada refiere a la EM como una enfermedad de naturaleza multifactorial en la que varios factores ambientales y metabólicos podrían jugar un papel en su desarrollo: infecciones víricas, intoxicación por metales pesados, tabaco, obesidad durante la infancia, niveles bajos de vitamina D y estilo de vida incluyendo hábitos dietéticos poco saludables.

Ninguno de los factores ambientales mencionados puede explicar, por sí solo, la enfermedad. Sin embargo, algunos factores se pueden considerar más determinantes para el desarrollo y curso de la EM (Riccio y Rosano, 2015):

- a. Distribución geográfica: la EM es más prevalente en los países occidentales con mayores ingresos y mayor distancia al ecuador. En estos países se dan factores como vida más sedentaria, dietas más calóricas con altas ingestas de grasas saturadas de origen animal y baja exposición a la luz solar (OMS y MSFI 2008).
- b. Efecto de la migración: con la migración desde un área de mayor incidencia de EM a otro de incidencia menor antes de los 15 años, se adquiere el menor riesgo de la zona de destino mientras que la migración después de esa edad no supone cambios en el nivel de riesgo. Esto podría estar relacionado con factores nutricionales más que con factores infecciosos o toxicológicos ambientales (McLeod et al., 2011).
- c. Baja disponibilidad de vitamina D: otro factor ambiental relacionado con la dieta y la distribución geográfica es la disponibilidad de vitamina D, que es menor a latitudes con menor exposición a la luz solar (Ascherio 2014). Los pacientes con EM presentan bajos niveles de vitamina D, lo cual también se observa en otras enfermedades inflamatorias crónicas (Yin y Agrawal, 2014).
- d. Inflamación postprandial: dietas ricas en grasas animales e hidratos de carbono refinados se asocian con inflamación postprandial (Margioris, 2009).

- e. Índice de masa corporal (IMC) elevado: un IMC elevado antes de los 20 años se asocia con un riesgo doble de desarrollar la enfermedad (Hedström et al., 2012). Debe tenerse en cuenta que el IMC está relacionado con la flora intestinal.
- f. Paralelismos con otras enfermedades inflamatorias relacionadas con hábitos dietéticos incorrectos: la EM tiene ciertas similitudes con enfermedades inflamatorias intestinales (Cantorna, 2012); en ambos casos se aprecian bajos niveles de vitamina D y están influenciadas por factores ambientales (Dam et al., 2013). La enfermedad inflamatoria intestinal es más frecuente entre pacientes de EM (Aharoni, 2013).

1.1.1. Impacto de la alimentación sobre el curso de las enfermedades inflamatorias

El estado nutricional podría influenciar el curso de la EM. Sin embargo, la cuestión es cómo las moléculas de origen dietético pueden exacerbar o disminuir los síntomas, y en general cómo podrían favorecer o reducir la inflamación a nivel molecular. En concreto, es importante clarificar cuáles son las dianas de las moléculas dietéticas y el mecanismo molecular relacionado si es que lo hay.

FACTORES DIETÉTICOS PROINFLAMATORIOS

Los componentes de la dieta que deben controlarse para evitar el aumento de los procesos inflamatorios en EM, así como en otras enfermedades inflamatorias crónicas, son los siguientes (Riccio y Rossano, 2015):

- Ácidos grasos saturados de origen animal
- Ácidos grasos insaturados trans
- Carne roja
- Bebidas azucaradas y, en general, dietas hipercalóricas ricas en hidratos de carbono refinados (y pobres en fibra).
- Ingestas elevadas de sal.
- Proteínas lácteas de las membranas de los glóbulos de grasa. La proteína más representativa de las presentes en la membrana de los glóbulos de grasa láctea,

la butirofilina, es muy similar a la glucoproteína del oligodendrocito asociado a la mielina (MOG), un antígeno que parece estar relacionado con la EM. Se han encontrado anticuerpos de butirofilina/MOG en EM y otras enfermedades como autismo (Riccio, 2004). Por lo tanto, los pacientes con EM deberían evitar los lácteos enteros u optar por desnatados.

Grasa de origen animal

Los ácidos grasos de origen animal, que podemos encontrar en alimentos como leche entera, mantequilla, queso, carne y procesados cárnicos, son los componentes de la dieta que más frecuentemente se tienen en cuenta por su influencia negativa sobre el curso de la EM.

Desde hace décadas se ha sugerido que el consumo de grasas animales saturadas se correlaciona directamente con la prevalencia de EM, pero la relación entre la restricción de grasa animal y la remisión de la EM no se demostró hasta 2006 (Pantano et al., 2006). Según este estudio, las dietas ricas en grasas promueven la síntesis y almacenamiento de grasas y colesterol y causa una reducción de la fluidez de la membrana y la posible obstrucción de capilares, así como el establecimiento o aumento de la inflamación.

Ácidos grasos trans

Los ácidos grasos *trans* son ácidos grasos insaturados que contienen al menos un doble enlace no conjugado en configuración trans.

Como productos de la hidrogenación parcial de aceites vegetales, se introdujeron en los años 60 para reemplazar a la grasa animal, pero tuvieron que pasar bastantes años hasta que se descubriera que también producen efectos nocivos, aumentan los niveles de colesterol y promueven la formación de depósitos de grasa abdominal y la ganancia de peso, más que las grasas saturadas. Los ácidos grasos trans se asocian a inflamación intestinal y sobreproducción de algunas citoquinas proinflamatorias (Lublin et al., 1996).

Carne roja

La carne roja contiene más hierro hemo que la carne blanca. El hierro es fácilmente nitrosilado, lo que facilita la formación de compuestos endógenos nitrosilados. De hecho, la ingesta de carne roja induce una formación de estos compuestos que es dosis-dependiente, lo que no se observa en carnes blancas. Estos compuestos nitrosilados son mutagénicos e inducen nitrosilación y daño en el DNA. Las carnes rojas procesadas y preservadas con nitritos aumentan este proceso (Battino et al., 2003). Así, se han encontrado depósitos anormales de hierro en los lugares de inflamación en EM (Swank et al, 2003).

Finalmente, la carne contiene ácido araquidónico, ácido graso poliinsaturado que es precursor de eicosanoides proinflamatorios como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Okada et al., 2013).

Altas ingestas de azúcar y baja ingesta de fibra

Las altas ingestas de bebidas azucaradas y cereales refinados, con bajo contenido en fibra, aumentan rápidamente la ingesta calórica y los niveles de glucosa. El subsiguiente aumento de la producción de insulina activa las rutas biosintéticas como, por ejemplo, la producción de ácido araquidónico y sus derivados proinflamatorios (Riccio y Rossano, 2015).

Altas ingestas dietéticas de sal

Las altas ingestas dietéticas de sal podría ser un factor de riesgo ambiental para el desarrollo de enfermedades autoinmunes al inducir la producción de citoquinas proinflamatorias (Kleinewietfeld et al., 2013).

Grasa láctea y proteínas de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche

Los glóbulos de grasa láctea se encuentran dispersos de forma homogénea y protegidos de la oxidación gracias a una membrana formada por lípidos y un tipo especial de proteínas conocidas como proteínas de la membrana del glóbulo de grasa de la leche

(MFGM por sus siglas en inglés “milk fat globule membrane”). Estas proteínas, que suponen sólo un 1% de las proteínas lácteas, son necesarias para la correcta formación de los sistemas digestivo, nervioso e inmune durante la lactancia en humanos. En adultos, las proteínas de la MFGM no juegan ningún papel y pueden eliminarse de la dieta junto con la grasa láctea (Riccio, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, la proteína de la MFGM más abundante es la butirofilina (BTN), que podría desempeñar un papel importante en la EM ya que es muy similar a MOG, uno de los antígenos candidatos en EM. BTN y MOG exhiben el mismo comportamiento en modelos experimentales de EM y se han encontrado anticuerpos de BTN y MOG en EM y otras enfermedades (Riccio, 2004).

Dietas hipercalóricas e inflamación postprandial

Después de cada comida, experimentamos un moderado y pasajero estrés oxidativo y una moderada respuesta inflamatoria dependiendo del tipo y cantidad de comida. Dietas en las que sean frecuentes las comidas ricas en sal, grasas animales, ácidos grasos trans y bebidas azucaradas suponen un mayor estrés para nuestro sistema inmune y esta alteración de la homeostasis puede llevar a alteraciones metabólicas e inmunitarias de naturaleza diversa.

El estrés dependiente de la dieta puede estar motivado por (Riccio y Rossano, 2015):

- La ingesta calórica: a mayor ingesta calórica, mayor es el estrés oxidativo inducido.
- Carga glucémica de la ingesta: picos glucémicos posprandiales agudos pueden inducir una liberación de insulina mayor de la necesaria.
- Patrón lipídico: grasas saturadas de origen animal, ácidos grasos trans y ácidos grasos poliinsaturados omega-6 promueven la inflamación posprandial. Como se verá a lo largo del trabajo, la inflamación posprandial es atenuada e incluso suprimida por los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y los polifenoles, así como por la restricción calórica y el ejercicio físico.

1.2. Influencia de la vitamina D en la evolución y pronóstico de pacientes con EM

1.2.1. Relación metabólica y epidemiológica entre vitamina D y EM

La vitamina D presenta actividad inmunomoduladora y representa la molécula dietética más prometedora para el tratamiento de enfermedades crónicas inflamatorias como la EM (Smith et al., 2007). La distribución de la EM coincide geográficamente con la duración e intensidad de la radiación UV de la luz solar. Sin embargo, a altas latitudes, donde durante gran parte del año la luz solar no es capaz de mantener la suficiente síntesis de vitamina D, la EM es menos frecuente entre la población costera con mayores ingestas de pescado azul, su principal fuente de vitamina D (Smith et al., 2007). Por lo tanto, estos datos sugieren que la especial distribución geográfica de la EM en el mundo podría atribuirse a una menor disponibilidad de vitamina D por esta menor exposición al sol en algunos países, y esta carencia de vitamina D activa podría ser uno de los factores ambientales que participan en la génesis de la enfermedad. Sin embargo, unos niveles bajos de vitamina D también podrían deberse a una alteración en su metabolismo y no sólo por una escasa exposición a la luz solar (Riccio et al., 2016).

La vitamina D₃ (colecalfiferol), sintetizada tras la exposición a la luz solar, es hidroxilada en el hígado a 25-(OH)D₃ (calcidiol) por las enzimas CYP27A1 o CYP2R1, y después activada en el hígado por la CYP27B1 a 1 α ,25-(OH)₂D₃ (calcitriol). Esta última, la forma activa de vitamina D, es inactivada por la CYP24A1 a 1 α ,24,25-(OH)₃D₃ (ácido calcitroico). Esto significa que los niveles de vitamina D activa dependen de los niveles relativos de su síntesis vía CYP27B1 y sus modificaciones vía CYP24A1 (Schuster et al., 2011). Una elevada expresión de la CYP24A1, inducida por compuestos endógenos y xenobióticos, podría suponer niveles bajos de vitamina y causar o intensificar las enfermedades inflamatorias crónicas. Todo esto nos indica la importancia del seguimiento del nivel de vitamina D en el curso de la administración de vitamina D.

Otro punto a tener en cuenta es el receptor de vitamina D (VDR). El metabolito activo de vitamina D, el 1 α ,25-(OH)₂D₃, se une al VDR y el complejo VDR-D controla la expresión de numerosos genes involucrados en procesos de potencial relevancia en enfermedades crónicas. Así, cuando evaluamos la efectividad de la suplementación con vitamina D en

el curso de la EM, debemos considerar la posibilidad del polimorfismo que afecta al VDR, que se ha asociado con obesidad, inflamación y alteraciones de la permeabilidad intestinal (Al-Daghri, 2014).

La relación entre ingesta de vitamina D y EM se estudió entre mujeres en dos extensas cohortes (182000 mujeres en total) a las que se realizó el seguimiento durante 20 años (Gil Hernández, 2010). La ingesta media de vitamina D se evaluó cada cuatro años utilizando un cuestionario de consumo de alimentos y se validó por su correlación frente a la concentración plasmática de 25(OH)-D y su correlación inversa frente al riesgo de fracturas. Durante el seguimiento se documentaron 173 casos de EM. Después de ajustar por edad, hábito tabáquico, y otros potenciales factores de riesgo, el riesgo de EM era un 40% menor entre las mujeres cuya ingesta era de al menos 400 UI/día de vitamina D a partir de suplementos. Así mismo, el riesgo de EM era un 31% menor entre el 20% de las mujeres de mayor ingesta de vitamina D, ya fuera por la dieta o por suplementos, comparado con el 20% de mujeres con menor ingesta.

El mecanismo por el cual la vitamina D ejerce un efecto protector ante la EM no se conoce, pero hay un creciente conocimiento sobre los efectos inmunomoduladores de la vitamina D que podría ser relevante para la EM (Ascherio et al., 2014).

Sin embargo, aunque se dispone de múltiples evidencias observacionales que indican que la nutrición puede jugar un papel importante en la EM, la terapia en EM no se combina hoy día con recomendaciones dietéticas. Esto puede deberse en parte a la falta de información de estudios clínicos ya que, hasta la fecha, se han realizado pocos. Los realizados, han estado más enfocados en la administración de suplementos dietéticos (Farinotti et al., 2012) o en dietas bajas en grasas saturadas (Swank y Goodwin et al., 2003). Otros ensayos clínicos se han centrado en la administración de un solo suplemento como la vitamina D o aceite de pescado (Ramirez-Ramirez et al., 2013). Un estudio más completo (Riccio et al., 2016) se centraba en evaluar el efecto de una dieta baja en calorías basada en los principios de la dieta mediterránea combinado con la administración de suplementos de vitamina D y otros suplementos nutricionales como aceite de pescado, ácido lipoico, resveratrol, y complejos multivitamínicos. El principal objetivo del estudio era investigar los efectos de una intervención dietética sobre el bienestar de pacientes de EM. Tanto los suplementos dietéticos como la baja ingesta

calórica tenían la finalidad de reducir la inflamación sistémica y, además, restablecer o mantener una flora intestinal saludable. Esto podía alcanzarse mediante diferentes mecanismos relacionados con receptores nucleares antiinflamatorios, factores transcripcionales y enzimas. Del estudio se deduce que la intervención dietética podría ser especialmente importante para los pacientes de EMPP, ya que no se cuenta aún con tratamiento farmacológico para ellos, pero podría ser también relevante para los pacientes de EMRR con tratamiento con IFN- β .

Una intervención nutricional basada en la restricción calórica, dieta semi-vegetariana y la administración de vitamina D, con o sin otros suplementos, pueden contribuir a contrarrestar la inflamación crónica, que es una característica común tanto de la EMPP como de la EMRR. El efecto antiinflamatorio se consigue por la activación de receptores nucleares y enzimas que aumentan el metabolismo oxidativo, reducen la síntesis de moléculas pro-inflamatorias, y restablecen o mantienen una flora intestinal saludable (Riccio et al., 2016).

Mientras que niveles bajos de vitamina D suponen un conocido riesgo potencial de EM, los efectos sobre pacientes de EM de dietas específicas y suplementos dietéticos son todavía bastante desconocidos. Algunos estudios sobre la asociación de la vitamina D con IFN- β sugieren que juntos podrían contrarrestar la enfermedad mediante su acción sinérgica (Stewart, 2012). Un efecto sinérgico similar podría esperarse de una dieta semi-vegetariana y la administración de suplementos. Si fuera así, uno de los beneficios que podría derivar de una intervención nutricional en pacientes de EMRR podría ser reducir la dosis de IFN- β y, por lo tanto, conseguir reducir la formación de anticuerpos vs IFN- β . Respecto a la EMPP, la eficacia de la intervención dietética en reducir el nivel de inflamación crónica o evitar que empeore podría significar frenar la progresión de la enfermedad.

Sobre estos principios, el valor añadido de asociar el tratamiento con recomendaciones dietéticas es importante por el hecho de que los factores dietéticos que podríamos calificar de “saludables”, es decir anti-inflamatorios, actúan tanto a nivel sistémico como intestinal. De hecho, es bien conocido que las endotoxinas liberadas de una flora intestinal disbiótica pueden contribuir al desarrollo de un estado de inflamación sistémica que a su vez puede favorecer los brotes de EM. Por lo tanto, la modificación

de una flora disbiótica por la dieta para establecer la eubiosis podría ser una estrategia para ayudar a manejar la progresión de la EM.

En conclusión, los datos obtenidos (Riccio et al., 2016) proporcionan importantes indicaciones para el manejo nutricional de los pacientes de EM, como son:

- Todos los pacientes de EM tienen niveles de vitamina D insuficientes o subóptimos.
- Los niveles de vitamina D no mejoraban ni por la administración de suplementos ni por la administración combinada de IFN- β , con o sin intervención nutricional o suplementos dietéticos.
- Una dieta basada en los principios de la dieta mediterránea, con o sin administración de suplementos dietéticos, determina un aumento de la relación entre ácidos grasos poliinsaturados omega-3/omega-6, lo que contribuye a la aminoración del estado inflamatorio.

Lo observado en este estudio está en línea con lo expuesto anteriormente acerca de las propiedades antiinflamatorias de la restricción calórica. Las ingestas hipercalóricas y las dietas ricas en hidratos de carbono refinados y azúcar aumentan los niveles de insulina y favorecen la biosíntesis y producción de moléculas proinflamatorias, así como la producción de radicales libres. La restricción calórica, conseguida por la reducción de la ingesta de alimentos o mediante el ayuno intermitente (un día sí y un día no), aumenta la adiponectina y activa sus receptores (Lee y Kwak et al., 2014), reduce el daño oxidativo, la activación linfocitaria y la progresión en modelos experimentales de EM (Piccio et al., 2008).

1.2.2. Sinergia entre vitamina D y estrógenos para la regulación de células T autoinmunes y prevención de la desmielinización

Las diferencias de incidencia por sexo en EM se han estudiado en profundidad por su potencial para dar información sobre su etiología. Para entender los mecanismos que subyacen en el rápido aumento global de casos de EM en mujeres jóvenes, se revisa en la literatura la posible influencia de la genética, las hormonas y el embarazo sobre el riesgo de EM (Whitacre, 2001).

Genética

La susceptibilidad genética a la EM afecta de forma diferente a hombres y mujeres (Sadovnick, 2013) y parece que la posibilidad de heredabilidad por línea materna es doble que por línea paterna (Chao et al., 2011; Chao et al., 2010). Las evidencias apuntan a que una posible hipometilación de ciertos genes, es decir, ciertas marcas epigenéticas durante la etapa intrauterina o en los primeros meses de influencia sobre todo materna podrían influenciar la expresión de ciertos genes y el riesgo de EM. Los detalles moleculares se desconocen, pero la influencia del medio determinado por la madre sobre el marcaje epigenético de las células T CD4+ del feto y del neonato sería una posible explicación (Burrell et al., 2011; Chao et al., 2009).

Pubertad

Durante la pubertad se dan cambios significativos a nivel hormonal y neuroendocrino. El paso a la pubertad afecta al riesgo de EM de forma diferente a hombres y mujeres (Rzeczowska et al., 2014). Mientras que la ratio de incidencia mujeres/hombre es 1,6 hasta los 12 años, a partir de los 13 años esta ratio aumenta hasta 3,7 (Duquette et al., 1987) o incluso mayor de 4 (Ghezzi et al., 2002). También parece que la edad de la menarquía correlaciona directamente con la edad de comienzo de la EM (Sloka et al., 2006) e inversamente con el riesgo de EM (Ahn et al., 2015). Tomados todos los datos en conjunto, los datos sugieren que los cambios hormonales durante la pubertad aumentan el riesgo de EM, sobre todo de EMRR, en mujeres.

Gestación

Algunos datos sugieren que el embarazo desencadena procesos protectores que reducen el riesgo de EMRR. Estudios epidemiológicos realizados en diferentes países indican que el riesgo de EM es mayor en mujeres que no hayan estado embarazadas que en mujeres que sí lo hayan estado (Runmarker et al., 1995; Ponsonby et al., 2012; Magyarai et al., 2013). Esto ha hecho que muchos investigadores sugieran que los cambios hormonales durante el embarazo reducen la susceptibilidad de las mujeres a la EMRR.

Sin embargo, estos datos deben tomarse con cautela ya que, por ejemplo, es de esperar que muchas mujeres opten por no ser madres tras el diagnóstico. Tampoco se puede descartar que ciertos anticonceptivos con acción antagonista de los estrógenos eleven el riesgo de EM (Hayes y Spanier, 2017).

Aumento de la incidencia de la EM en mujeres

Globalmente, la EM afectaba a hombres y mujeres por igual hasta la década de 1950, en que se informó por primera vez de que el número de mujeres era mayor que el de hombres (Acheson et al., 1960). A continuación, se enumeran las hipótesis que explicarían este aumento de la incidencia en mujeres:

- Tabaco: el tabaco correlaciona con el riesgo de EM (Wingerchuk, 2012) y este riesgo es mayor en mujeres (Ramagolapan et al., 2013; O’Gorman y Broadley, 2014). El aumento relativo de mujeres fumadoras ha aumentado el riesgo de EM en mujeres.
- Infección por el virus de Epstein-Barr: las infecciones por el virus de Epstein-Barr, sobre todo la mononucleosis, correlaciona con el riesgo de EM de manera que el riesgo de EM es 2,6-3,9 veces mayor en caso de infección por virus de Epstein-Barr que en no infectadas (Ascherio y Munger, 2010; Almohmee et al., 2013). El aumento de las tasas de exposición tardía al virus de Epstein-Barr en mujeres (Dunmire et al., 2015) podría haber aumentado el riesgo de EM en mujeres.
- Bajos niveles de vitamina D: bajos niveles de vitamina D correlacionan con mayor riesgo de EM como ya hemos visto. La tendencia global a unos niveles menores de vitamina D debido a menores exposiciones a la luz solar y a menores ingestas (Holick, 2007) habría aumentado el riesgo de EM en mujeres.
- Sinergia entre estrógenos y vitamina D: como hemos visto, la pubertad aumenta el riesgo de EM en mujeres, así como bajos niveles de vitamina D; los modelos animales han demostrado que los estrógenos y la vitamina D interactúan de manera sinérgica en las células T CD4+ (Nashold et al., 2009; Spanier et al., 2015; Hayes et al., 2015).

1.3. Influencia de la vitamina B12 en la evolución y pronóstico de pacientes con EM

1.3.1. Fisiología de la vitamina B12

La vitamina B12 es absorbida en el intestino y cumple diversas funciones metabólicas. Una vez que el alimento que contiene vitamina B12 está en el intestino, se une a la proteína ligante R, que libera a la vitamina de su unión al factor intrínseco, producido este último por las células parietales del estómago. Por último, la vitamina B12 (cobalamina) se transforma a transcobalamina II, que es liberada a la circulación para ser rápidamente utilizada en médula ósea, hígado y cerebro (Reynolds et al., 1991). Las deficiencias en vitamina B12 se pueden dar cuando hay alguna alteración a lo largo de este proceso. Primero, la deficiencia puede ocurrir si la proteína ligante R no es capaz de unirse a la vitamina B12, lo que reduce su absorción (Miller et al., 2005). Segundo, si las células parietales del estómago están dañadas o no secretan el factor intrínseco tampoco se unirá a la proteína ligante R ni alcanzará la circulación. Por último, si no se produce la conversión a transcobalamina tampoco se producirá su absorción (Kalarn y Watson, 2017).

1.3.2. Problemas neurológicos asociados con la vitamina B12

La deficiencia de vitamina B12 puede producir múltiples problemas neurológicos y sistémicos que son similares a los síntomas de la EM. Su deficiencia mantenida durante 3-6 años puede provocar desmielinización, degeneración y muerte axonal, destrucción autoinmune de las células parietales y atrofia de la mucosa gástrica (Wade et al., 2002). Algunos investigadores creen que esto podría ser un factor precursor de EM y otras enfermedades neuroinflamatorias.

1.3.3. Metabolismo de la vitamina B12

Para entender el metabolismo de la vitamina B12 y sus efectos en la esclerosis múltiple, tenemos que profundizar en el conocimiento de la vaina de mielina que está dañada en

pacientes con EM. La vaina de mielina es un aislante de los axones que conecta las neuronas a través del cerebro. Los axones son los encargados de transmitir la señal electroquímica a lo largo de distancias espaciales relativamente largas en el cerebro para crear una red de comunicación. Para que la información electroquímica se transmita correctamente, los axones necesitan estar aislados para evitar la pérdida de la señal y aumentar la velocidad de conducción. En la EM, como se ha mencionado anteriormente, las vainas de mielina son atacadas por el sistema inmunitario, lo que produce la desmielinización de los axones y, por lo tanto, un debilitamiento de la señal de transmisión (Reynolds, 1992). Esta desmielinización afecta directamente al sistema motor del paciente y a su tiempo de reacción.

La vitamina B12 es un importante cofactor de muchas enzimas como, por ejemplo, la metionina sintasa, clave en la EM. Aunque se verá en más detalle en el apartado correspondiente a la relación entre homocisteína y EM, se puede adelantar en este punto que esta enzima es la responsable de la conversión de homocisteína a metionina (Reynolds, 1992). Ante un déficit de vitamina B12, esta enzima puede no ser capaz de realizar esta conversión lo que supone la acumulación de homocisteína y la falta de metionina. El déficit de metionina puede producir defectos en la síntesis de DNA y, además se ha relacionado con la producción de fosfolípidos de colina defectuosos, responsables de complicaciones neurológicas en la formación de mielina en torno al axón.

La enzima metilmalonil CoA sintasa requiere vitamina B12 como cofactor y participa en la conversión de metilmalonil CoA a succinil CoA (Nijst et al., 1990). En este caso, la deficiencia de vitamina B12 produciría la acumulación de metilmalonil CoA, lo que a su vez produce la formación e incorporación de ácidos grasos a los lípidos neuronales e interfiriendo así en la formación de mielina. Esto está producido por la metilación de los ácidos grasos de la proteína básica de mielina, uno de los componentes principales de la estructura de mielina del SNC (Reynolds, 1992). La formación defectuosa de estas vainas de mielina puede desencadenar la respuesta autoinmune.

1.3.4. Efectos inmunorreguladores de la vitamina B12

La vitamina B12 tiene muchos efectos inmunorreguladores como, por ejemplo, la modulación de citoquinas (como el TNF- α) o la activación y proliferación de células inmunocompetentes (Miller et al., 2005). En ambos casos, se trata de situaciones que podrían exacerbar la EM al activarse la respuesta inmune y por afectar al proceso de reparación de la mielina. Un aumento en la proliferación de células inmunocompetentes requiere un aumento de vitamina B12. Si el ciclo de mielinización y desmielinización continúa, la necesidad de vitamina B12 será mayor, lo que podría producir un déficit de vitamina (Karlan y Watson, 2017).

1.3.5. Papel del estrés oxidativo en la neurodegeneración

El SNC mantiene una regulación extremadamente precisa de todos sus metabolitos, pero puede producirse estrés oxidativo en caso de déficit de vitaminas del grupo B. El estrés oxidativo se da cuando el organismo no es capaz de capturar los radicales libres producidos mediante reacciones en las que intervienen vitaminas. Los radicales libres causan diversos problemas como daño en el DNA y apoptosis, lo que generalmente produce neurodegeneración así como degeneración de otros tejidos. Una disminución en los niveles de folato y un aumento en los niveles de homocisteína causan estrés oxidativo, el cual podría suponer, potencialmente, el comienzo de la neurodegeneración y la EM (Karlan y Watson, 2017).

1.4. Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados dietéticos en la evolución y pronóstico de pacientes con EM

Los vegetales y sus aceites contienen los ácidos grasos esenciales linoleico (omega-6) y linolénico (omega-3). Sus efectos son opuestos y su presencia en la dieta debería ser equivalente (Schmitz y Ecker, 2008). Sin embargo, en las dietas occidentales, la relación omega-6/omega-3 ha aumentado de 6 a 15 en los últimos años, lo que conduce a mayores incidencias de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. De hecho, el ácido linoleico produce la formación de ácido araquidónico (AA), precursor éste de

compuestos proinflamatorios como eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. La síntesis de estos eicosanoides está favorecida por la insulina, sin embargo, puede ser inhibida por el ácido acetilsalicílico y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 como el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA), que derivan del ácido linolénico (Riccio y Rossano, 2015).

Ambos, DHA y EPA, se encuentran en mariscos y pescados grasos y sus aceites. Tienen importantes actividades antiinflamatorias, antitrombóticas e inmunomoduladoras comparables con las de las estatinas (Calder, 2006; Farooqui et al., 2007). Estos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga inhiben los procesos inflamatorios y la síntesis de ácidos grasos y de colesterol. Con esta información, en enfermedades inflamatorias crónicas como la EM, los ácidos grasos omega-3 deberían predominar en la dieta sobre los omega-6. Se debe mencionar que el DHA está presente en altas concentraciones en el cerebro y que sus niveles disminuyen en pacientes con EM.

1.4.1. Mecanismos de acción

La composición en ácidos grasos de las membranas neuronales influye en su función al tener efectos directos sobre las propiedades biofísicas de la membrana (Di Biase et al., 2017). El cerebro tiene niveles especialmente altos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), sobre todo DHA y AA, que son sensibles a las alteraciones en la ingesta dietética (Guesnet y Alessandri, 2011; Pawlosky et al., 2001). En mamíferos, el DHA en forma libre atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica (Ouellet et al., 2009). El DHA es un componente esencial de los fosfolípidos porque mantiene la óptima fluidez de la membrana, definida ésta como el punto entre el estado gel y el cristal líquido. Concentraciones altas de DHA entre la bicapa lipídica de las neuronas proporcionan a las membranas neuronales la suficiente flexibilidad y fluidez requerida para la transmisión sináptica y mejora el funcionamiento de los canales iónicos y de los receptores (Suzuki et al., 1998; Chytrova et al., 2010; Teague et al., 2002).

La segunda función principal de los PUFAs es el efecto de los omega-3 sobre la expresión génica. Los genes a los que afecta esta regulación están involucrados en diversas funciones como el metabolismo de lípidos, transducción de señales, metabolismo

energético, receptores, regulación de quinasas, proteínas sinápticas y proteínas de membrana (Mirnikjoo et al., 2001; Jiang et al., 2013).

Además, los PUFAs tienen un papel como precursores de diversas moléculas involucradas en procesos inflamatorios. Tal y como se ha mencionado anteriormente, los omega-6 y los omega-3 tienen funciones opuestas: los omega-6 son precursores de moléculas proinflamatorias y los omega-3 lo son de antiinflamatorias (Di Biase et al., 2017). Los mecanismos de la acción antiinflamatoria de los omega-3 son debidos a alteraciones de la composición de ácidos grasos de las membranas celulares, inhibición de la activación del factor de transcripción proinflamatorio FN-kB y activación del factor de transcripción antiinflamatorio PPAR γ (Calder, 2015).

1.4.2. PUFAs omega-3 y mielina

Hay una evidencia creciente de que los omega-3 son capaces de modular, directa e indirectamente, la actividad neurológica a diferentes niveles, operando en diversos mecanismos. En los modelos *in vitro* desarrollados para identificar los ácidos grasos relacionados con el proceso de mielinogénesis se ha demostrado que el EPA regula la expresión génica de las proteínas de la mielina. El efecto beneficioso del EPA está mediado, al menos en parte, por la estimulación del proceso de reparación de la mielina además de por reprimir las respuestas inflamatorias inmunes en el SNC (Di Biase et al., 2017). De hecho, se observó un aumento de la expresión de proteínas de la vaina de mielina y una mejora de la integridad de la vaina de mielina.

1.5. Influencia de los niveles de homocisteína plasmática en la evolución y pronóstico de pacientes con EM

1.5.1. Homocisteína: definición y metabolismo

La homocisteína (Figura 1) fue descrita por primera vez por Butz y du Vigneaud en 1932, que la sintetizaron a partir de metionina (Figura 1) en presencia de ácido sulfúrico. La homocisteína es un aminoácido azufrado estrechamente relacionado con la metionina

y la cisteína. No existe un codón específico para este aminoácido por lo que la homocisteína no está presente de forma natural en las proteínas. Toda la homocisteína del organismo se forma durante el metabolismo de la metionina, un aminoácido esencial (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003).

La homocisteína reducida tiene un grupo tiol libre muy reactivo, que puede participar en reacciones redox y que es susceptible de autooxidarse a pH fisiológico, formando por tanto puentes disulfuro entre dos moléculas de homocisteína (homocistina) o disulfuros mixtos con cisteína. Alternativamente, la homocisteína reducida puede formar puentes disulfuro con proteínas como, por ejemplo, la albúmina. En la célula, la homocisteína está presente principalmente en su forma reducida. Su salida de la célula parece estar regulada por un transportador de homocisteína reducida (Blom, 2000). Extracelularmente, la homocisteína se encuentra principalmente en su forma oxidada, ya sea como disulfuro o unido a proteínas.

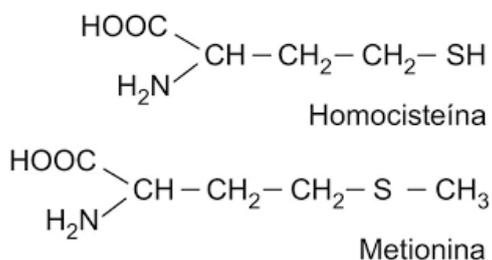


Figura 1: Estructura molecular de la homocisteína y la metionina (Fuente: elsevier.es)

Algunos estudios (Chambers et al., 2000b; Chambres et al., 2001) apuntan a la posibilidad de que la forma libre reducida de homocisteína podría ser en gran parte responsable de los efectos vasculares adversos. La fracción de homocisteína reducida normalmente sólo constituye entorno al 1% del total de homocisteína en plasma, pero es mayor en fumadores y en caso de enfermedad renal severa. Esta forma reactiva correlaciona estrechamente con efectos vasculares adversos.

Cerca del 70% de la homocisteína plasmática está unida a albúmina. El resto forma disulfuros, sobre todo con cisteína o como dímero de homocisteína-homocistina. Sin embargo, se sabe relativamente poco acerca de la formación de diferentes compuestos

de homocisteína *in vivo*. La suma de todas las formas se conoce como homocisteína total.

Los análisis rutinarios generalmente miden la homocisteína total en plasma o suero, a veces en líquido cefalorraquídeo y rara vez en orina. Las concentraciones séricas son normalmente algo superiores que los niveles en plasma debido a las condiciones pre-analíticas. El análisis de las diferentes fracciones de homocisteína total (oxidada o reducida, libre o enlazada) es difícil y sólo se realiza para investigación (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003). Hay tres enzimas directamente relacionadas con el metabolismo de la homocisteína: metionina sintasa (MS), betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT), y cistiotina β -sintasa (CBS). El metabolismo de la homocisteína es extremadamente sensible al estado nutricional y a las vitaminas B₆ y B₁₂, cofactores de estas enzimas, y el folato, que es un sustrato en la reacción mediada por MS.

El hígado y el riñón parecen ser los órganos más importantes de eliminación de homocisteína. Sin embargo, sólo el 1% de la homocisteína filtrada en el glomérulo se encuentra en la orina. El resto es reabsorbida y metabolizada. Así, los riñones metabolizan homocisteína más que excretarla.

Los niveles plasmáticos de homocisteína total están influenciados por la edad, género, la menopausia y otros determinantes fisiológicos.

Los niveles plasmáticos de homocisteína total aumentan con la edad en ambos sexos. Antes de la pubertad, los niños y las niñas tienen niveles bajos y similares (valores medios de 6 $\mu\text{mol/L}$) (Bates et al., 2002). Durante la pubertad, los niveles aumentan notablemente, más en varones que en mujeres. Al mismo tiempo, los niveles de homocisteína total comienzan a mostrar una distribución asimétrica entre poblaciones.

A lo largo de la vida, los valores medios de homocisteína total aumentan entre 3-5 $\mu\text{mol/L}$. A la edad de 40-42 años, hay una diferencia de 2 $\mu\text{mol/L}$ entre hombres y mujeres, con valores medios de entorno 11 y 9 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (Bates et al., 2002; Nygard et al., 1995).

Después de la menopausia, las diferencias en homocisteína total relacionadas con el género disminuyen, pero las concentraciones continúan siendo menores en mujeres

que en hombres (Nygard et al., 1995; Morris et al., 2000). La asimetría por género podría explicarse en parte por el estado hormonal.

La mayor masa muscular relativa en hombres podría también explicar alguna de las diferencias ya que la formación de creatina genera homocisteína.

Los hábitos nutricionales también difieren a veces entre sexos, los cuales pueden contribuir a disminuir los niveles de homocisteína total en mujeres. Puede que incluso factores psicológicos contribuyan a estas diferencias (Stoney y Engebretson, 2000).

Durante el embarazo, las concentraciones de homocisteína total se reducen hasta en un 50% con los valores más bajos en el segundo trimestre, pero los niveles vuelven a los valores previos a los 2-4 días después del parto. El mayor volumen plasmático, el aumento del metabolismo, el aumento de la filtración glomerular y el metabolismo fetal de homocisteína podrían explicar estas variaciones (Walker, 1999).

La mayor concentración de homocisteína total observada en personas mayores podría ser consecuencia de un enlentecimiento general del metabolismo, aumento de la prevalencia de malabsorción intestinal o el insuficiente suministro nutricional de folato, vitaminas B₁₂ y B₆, función renal disminuida y otros cambios fisiológicos relacionados con la edad, o estar asociado con enfermedades. Se ha observado que la distribución de vitaminas no es óptima en la mayoría de las personas mayores (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003).

La nutrición y estilo de vida son factores importantes que determinan la homocisteína total y podrían, en gran parte, explicar por qué los valores medios de homocisteína total varían entre poblaciones. Por ejemplo, se ha visto que los valores son menores en franceses que en irlandeses y, sin embargo, son similares entre enfermos cardiovasculares de ambos países (Malinow et al., 1996).

1.5.2. El ciclo de la homocisteína

La homocisteína se metaboliza principalmente a través de dos rutas: la transulfuración y la metilación (Figura 2). Normalmente, alrededor del 50% es remetilada para formar metionina, de donde deriva originalmente.

El restante 50% se convierte por la ruta de la transulfuración en cisteína previa condensación con serina para formar cistatiotina (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003).

La homocisteína se forma por demetilación del aminoácido esencial metionina en el ciclo de metilación (Figura 2). La metionina es un aminoácido esencial y se obtiene de la proteína dietética. Contiene un grupo metilo que puede activarse por conversión a S-adenosilmetionina (SAM). En cada célula, la metionina se reparte entre la síntesis de proteína y la formación de SAM. La formación de SAM está mediada por adenosín trifosfato (ATP) y tres isoenzimas de la metionin adenosil transferasa (MATI, II y III). Hay dos genes que codifican para MAT, uno que se expresa exclusivamente en el hígado (MAT1A), y otro (MAT2A) en todos los tejidos. Esta reacción mediada por MAT está regulada por las concentraciones intracelulares de SAM. La deficiencia de MAT resulta en niveles altos de metionina con niveles de SAM bajos (Mato et al., 2002).

El grupo metilo de la mitad metionina de la SAM es muy reactivo debido a la carga positiva en el átomo de azufre al que está unido. Este grupo metilo puede fácilmente transferirse a varios sustratos, incluyendo ácidos nucleicos (DNA y RNA), proteínas, fosfolípidos, mielina, polisacáridos, colina, catecolaminas, y amplio rango de pequeñas moléculas.

SAM es el principal donante biológico de grupos metilo del organismo y el único donante de metilos del líquido cefalorraquídeo y es necesario para numerosas reacciones de metilación. Un producto de todas las reacciones de metilación a partir de SAM es la S-adenosil-homocisteína (SAH), que es hidrolizada a homocisteína en una reacción reversible (de hecho, la reacción inversa está favorecida). Por lo tanto, el aumento de los niveles de homocisteína total supone también un aumento de los niveles de SAH. La elevación crónica de los niveles de homocisteína total plasmática, asociada con polimorfismos genéticos o deficiencias de vitaminas, puede tener un efecto indirecto y negativo en las reacciones de metilación celulares a través de un aumento paralelo de los niveles de SAH intracelulares, ya que SAH compite con la SAM por los lugares de unión. La SAM también es necesaria para la síntesis de las poliaminas espermidina y espermina, implicadas en el metabolismo celular (Yi et al., 2000).

Considerando el papel esencial de la metilación en procesos celulares vitales como la síntesis de neurotransmisores y la regulación de la expresión génica, se entiende que

cualquier alteración en la disponibilidad de SAM puede afectar al crecimiento, diferenciación y función celular. Esto puede ser crítico en muchas situaciones incluyendo el envejecimiento cerebral, donde los procesos neuroquímicos relacionados con la metilación pueden estar disminuyendo, y en enfermedades psiquiátricas y neurológicas (Costello y Plass, 2001).

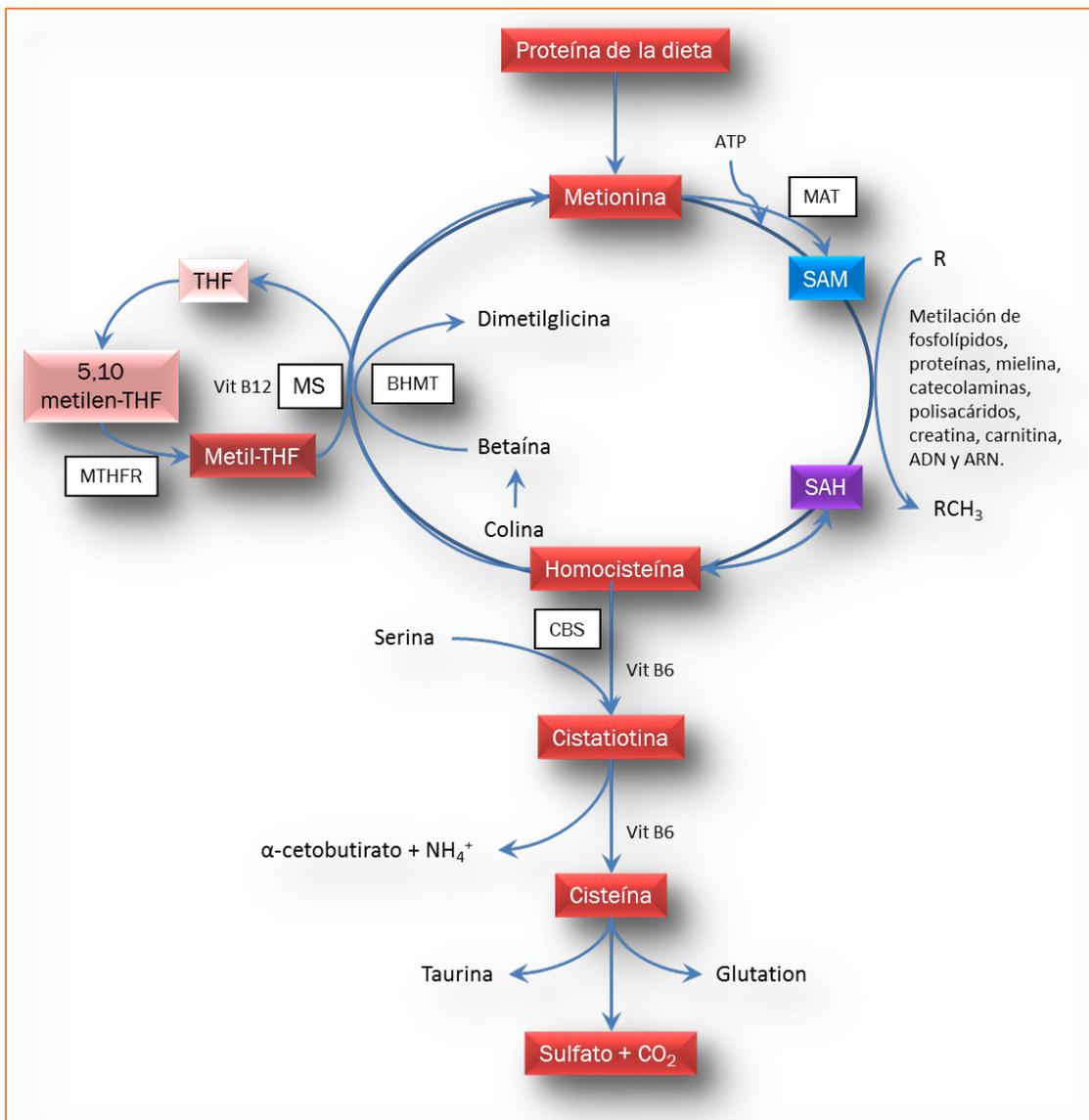


Figura 2: Ciclo de la homocisteína (elaboración propia a partir de (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003)

En la mayoría de tejidos la homocisteína puede ser remetilada a metionina por la enzima dependiente de vitamina B₁₂ metionina sintasa (MS). Unos pocos tejidos, entre ellos el

hígado y los riñones, expresan además la enzima betaina homocisteína metiltransferasa (BHMT) que actúa como una ruta alternativa para la remetilación de homocisteína a SAM. Sin embargo, la mayoría de tejidos, incluyendo el líquido cefalorraquídeo, son totalmente dependientes del reciclado de homocisteína mediado por MS (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003).

Un complicado sistema de retroalimentación regula el metabolismo de la homocisteína. En el caso de que el balance de metionina es negativo y las concentraciones de SAM son bajas, entonces la homocisteína es principalmente dirigida hacia la ruta de remetilación para formar metionina por la reacción mediada por MS. La vitamina B12 es un cofactor y el metiltetrahidrofolato (metil-THF), un sustrato de esta reacción (Mudd, 1989).

Cuando la concentración de homocisteína total aumenta, SAH también aumenta. SAH tiene múltiples efectos metabólicos. Es un potente competidor de SAM por diferentes puntos de unión y puede, por tanto, inhibir la metilación. Por todo esto, la relación SAM/SAH puede usarse como indicador del estado de metilación (Mudd, 1989).

El metil-THF se forma en una reacción catalizada por metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), en la cual el 5,10-metilen tetrahidrofolato se reduce a 5-metiltetrahidrofolato (metil-THF). La reacción mediada por MTHFR es un paso limitante en la formación de metil-THF en el metabolismo del folato. Esta reacción es especialmente importante en la formación de metionina a partir de homocisteína, ya que el metil-THF actúa como sustrato para MS. MTHFR tiene, por tanto, una fuerte e indirecta influencia en la remetilación de homocisteína (Engbersen et al., 1995).

1.5.3. El ciclo del folato

El tetrahidrofolato se requiere para la formación de 5,10-metilen-THF y 10-formil-THF (figura 3), usados en la síntesis de timidilato y purina respectivamente. Las purinas se necesitan para la síntesis de DNA y RNA. Dos de los átomos de carbono de las bases de purinas derivan del folato. La síntesis de DNA depende de timidina, para cuya formación se necesita timidilato sintasa. La timidilato sintasa es una enzima clave para la proliferación celular.

Una baja actividad de la MS, independientemente del motivo y que puede incluir un déficit vitamínico, conduce a una acumulación de metil-THF. Los folatos quedan retenidos y el conjunto de folato intracelular se vuelve anormal. Además, la retención intracelular de folato puede estar dañada. Como consecuencia, los niveles séricos de folato podrían ser altos a pesar de una deficiencia intracelular.

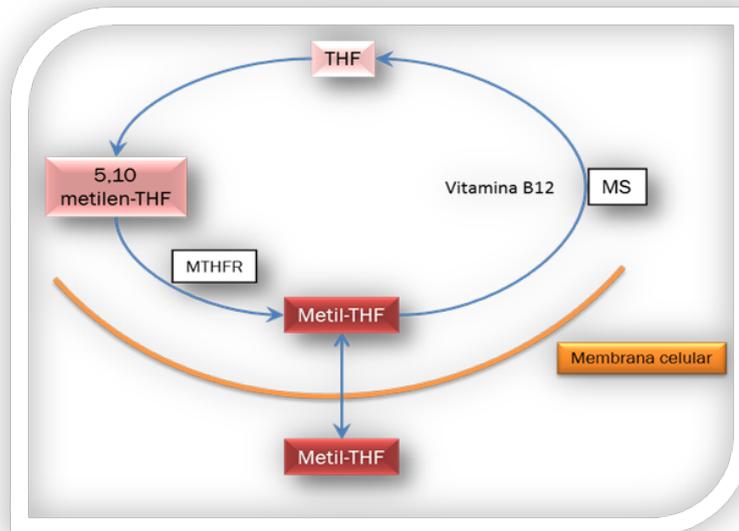


Figura 3: Ciclo del folato (elaboración propia a partir de (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003)

Por el mismo mecanismo, la deficiencia de vitamina B₁₂ puede causar una anemia megaloblástica indistinguible de la anemia causada por deficiencia primaria de folato.

Una actividad reducida de la MTHFR, sin embargo, que resulta en unos bajos niveles intracelulares de metil-THF, también causa niveles relativamente altos de 10-formil-THF y 5,10-metiletetrahydrofolato. La síntesis de DNA y RNA podría entonces estar preservada y no se desarrollaría anemia. Sin embargo, esto ocurre a expensas de las reacciones dependientes de SAM (Lalouschek et al., 2000).

1.5.4. Impacto del ciclo de la homocisteína en la regulación epigenética

La epigenética estudia los cambios de determinadas “marcas” en el genoma que son copiadas de una generación celular a otra y que pueden alterar la expresión genética pero que no implican cambios en la secuencia de bases de ADN. Estas “marcas” incluyen la metilación de citosinas dentro del dinucleótidos CpG (dinucleótidos citosina-fosfatoguanina) y las modificaciones postraduccionales de las histonas, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, que forman parte de los nucleosomas. La suma de estos patrones de modificación de las bases del DNA y de las histonas es lo que se conoce con el nombre de epigenoma (Gil Hernández, 2010). Actualmente se supone que el epigenoma es el resultado de las exposiciones de un individuo y de sus generaciones anteriores a las influencias ambientales, incluido el estado nutricional y la exposición a las dietas que, en algunos casos, quedan registrados en el genoma. Algunas de estas marcas epigenéticas permanecen durante múltiples generaciones celulares y se revelan en cambios en la expresión génica y en la función celular, permitiendo la plasticidad de fenotipos sobre la base de un mismo genotipo. Por ejemplo, los gemelos monocigóticos muestran diversidad epigenética con la edad y con los diferentes estilos de vida (Gil Hernández, 2010). De este modo, la epinutrigenética es una disciplina que estudia el marcado epigenético y cómo los componentes de la dieta influyen en él. Diferencias en dicho marcado pueden contribuir a explicar el riesgo de padecer enfermedades de individuos concretos, así como algunas variaciones interindividuales en la respuesta a intervenciones nutricionales, asociadas con cambios en la expresión génica.

1.5.5. Modificaciones epigenéticas dependientes de metilación

Dentro del núcleo celular, las unidades fundamentales de cromatina son conocidas como nucleosomas. Cada nucleosoma está formado por 147 pares de bases estrechamente empaquetados alrededor de un octámero de histona el cual está constituido por dos copias de las cuatro histonas básicas (H2A, H2B, H3 y H4). La histona de unión H1 enlaza con el DNA y su función es la de estabilizar las estructuras de cromatina. Además, cada proteína de histona consta de una zona central globular y un

extremo N-terminal que queda expuesto y que contiene multitud de residuos de aminoácidos potencialmente modificables (Landgrave-Gómez et al., 2015).

Se han descrito diferentes modificaciones en residuos de aminoácidos de histonas. Las modificaciones postranscripcionales de histonas incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación entre otras (Sassone-Corsi, 2013).

Los principales aminoácidos que son sustratos de estas modificaciones son la lisina, la arginina y la treonina (Rothbart y Strahl, 2014).

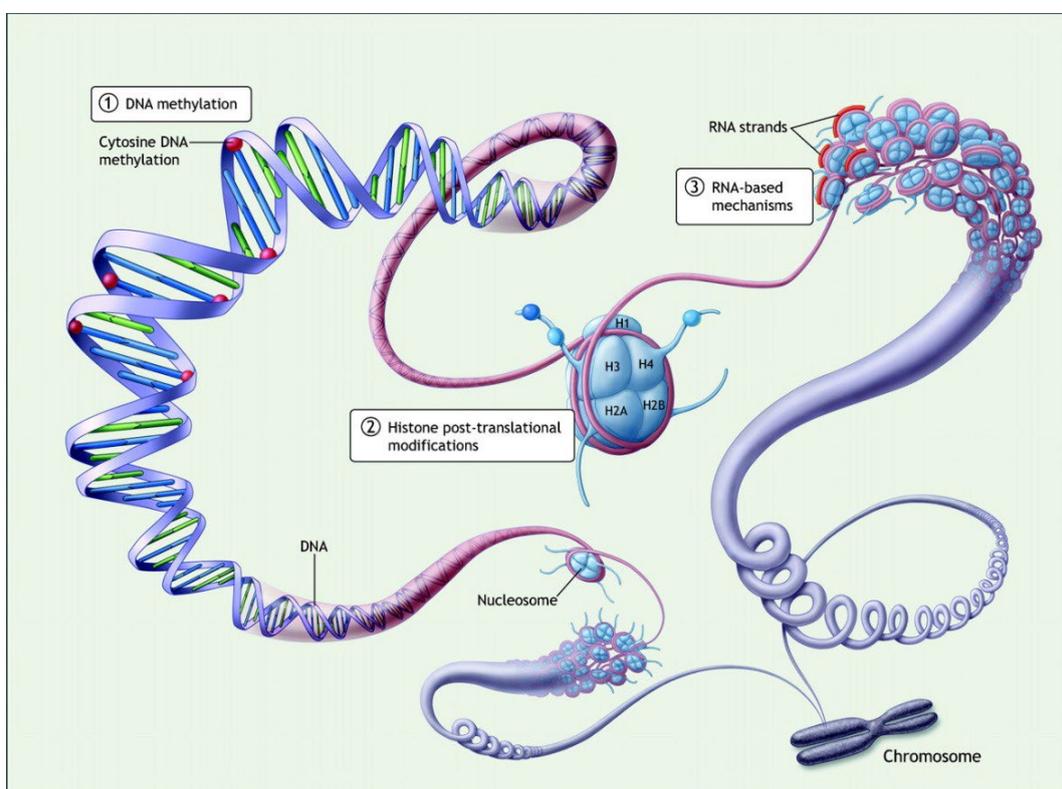


Figura 4: Estructura de la cromatina

<http://circres.ahajournals.org/content/102/8/873/F1.expansion.html> (Matouk y Marsen, 2008)

Estas modificaciones se asocian con la represión o la activación de la transcripción de genes dependiendo del punto de modificación, lo que sugiere la existencia de un código de histonas. Esta hipótesis propone que modificaciones específicas de histonas inducen a interactuar con proteínas asociadas con cromatina produciendo una respuesta regulatoria diferencial de la expresión génica. Estas modificaciones son dinámicas en el sentido de que son activamente añadidas y eliminadas por enzimas modificadores de

histonas específicos, lo que es esencial para coordinar el control transcripcional (Strahl y Allis, 2000).

1.5.6. Metilación de histonas

La metilación de histonas se asocia normalmente con múltiples procesos como la activación y represión transcripcional, dependiendo del residuo de aminoácido modificado. Estas modificaciones tienen lugar principalmente sobre residuos de arginina y lisina. Además, estos residuos pueden encontrarse mono-, di- o tri-metilados, pudiendo cada una de estas formas constituir señales epigenéticas específicas. A este respecto, estudios actuales demuestran que los residuos de lisina pueden metilarse hasta tres veces mientras que los de arginina pueden metilarse dos (Strahl y Allis, 2000).

1.5.7. Metilación de DNA

La metilación del DNA es la transferencia de un grupo metilo generalmente al dinucleótido CpG (Klose y Bird, 2006). Cuando se metila simétricamente, los grupos metilo promueven un cambio conformacional de la estructura del DNA. La principal consecuencia de estas modificaciones es que varios factores de transcripción no pueden reconocer el DNA y así inducen la represión de la transcripción (Prokhortchouk y Defossez, 2008).

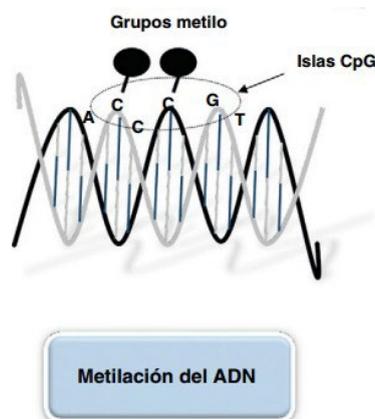


Figura 5: Metilación de DNA

<http://www.elsevier.es/es-revista-angiologia-294-articulo-genetica-epigenetica-proteomica-los-aneurismas-90136720> (Moñux Ducaju et al., 2012).

La metilación del DNA genera patrones que se establecen durante el desarrollo embrionario y se mantienen cuando en DNA se replica. Sin embargo, estos patrones pueden modificarse con el tiempo debido principalmente a factores ambientales tales como la nutrición, el ejercicio o agentes químicos. La metilación del DNA se lleva a cabo por un conjunto de proteínas llamadas DNA metiltransferasas. Hay dos grupos de estas proteínas: uno para la metilación *de novo*, y otro para el mantenimiento de la metilación. Ambas enzimas difieren dependiendo del sustrato de ADN: por ejemplo, el mantenimiento de la metilación de DNA se realiza por DNA metiltransferasa 1. Estas proteínas añaden grupos metilo a patrones metilados preexistentes durante la replicación del DNA. Por otra parte, la metilación *de novo* la realizan las DNA metiltransferasas 3a y 3b. Tales proteínas son responsables de la adición de nuevos grupos metilo a citosinas que no han sido metiladas previamente (Goll y Bestor, 2005).

1.5.8. Impacto de alteraciones en el ciclo de un carbono e hiperhomocisteinemia sobre algunas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas

Como ya se ha comentado anteriormente, la homocisteína es un aminoácido sulfurado que se genera a partir de un aminoácido esencial: la metionina. Los niveles fisiológicos de homocisteína en población sana están determinados primero por la ingesta dietética de metionina, folato y vitamina B₁₂. Numerosos estudios señalan que también el estilo de vida, el consumo excesivo de alcohol o café, el tabaco o el sedentarismo, juegan un papel en la modulación de los niveles plasmáticos de homocisteína sin olvidar que niveles elevados de homocisteína se dan con el envejecimiento y la disminución de la función renal (Ansari et al., 2015).

Las investigaciones sobre los efectos potencialmente nocivos de niveles elevados de homocisteína se centraron en un primer momento en el daño vascular, que fue el hallazgo predominante en pacientes con homocistinuria. Así, como podemos ver en Zhou y cols. (Zhou et al., 2014), desde que se sugirió en 1999 la relación entre enfermedad cardiovascular y homocisteína mediada por cambios epigenéticos, el número de estudios al respecto es elevado. En la actualidad se asume esta relación y se

baraja la posibilidad de que la hiperhomocisteinemia podría iniciar la aterogénesis por modificaciones en la metilación del DNA.

Los mecanismos vasculares se han estudiado extensamente tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios *in vitro* sugieren que la homocisteína podría inducir daño directo en las células endoteliales, incrementar la actividad de las plaquetas, tener efecto procoagulante, incrementar la síntesis de colágeno y potenciar la proliferación de células de tejido muscular liso (Bolander-Gouaille y Bottiglieri, 2003). En estudios *in vivo*, se ha observado hipometilación en las células de músculo liso vascular de las placas ateroscleróticas y esta hipometilación se correlaciona con aumento de la actividad transcripcional que podría afectar a la proliferación celular. La hiperhomocisteinemia podría incrementar las concentraciones de SAH y reducir las de SAM y potenciar la actividad de la DNA metiltransferasa. En este sentido, los estudios concluyen que los efectos perjudiciales de la homocisteína dependen de la concentración de ésta y así, mientras hiperhomocisteinemias moderadas influenciarían la expresión génica sobre todo por interferir en el metabolismo del grupo metilo, las severas provocarían efectos aún más perjudiciales al aumentar el estrés oxidativo, promoviendo la apoptosis y procesos inflamatorios (Nicolescu y Haggarty, 2011).

El estudio de la relación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad neuropsiquiátrica es más reciente, aunque ya se conociera que los mecanismos patológicos vasculares son también relevantes para el daño neuropsiquiátrico y que el daño vascular puede contribuir no sólo a la demencia sino también a otras enfermedades neuropsiquiátricas. De hecho, como el tejido cerebral carece de la enzima betaina-homocisteína-metiltransferasa, la ruta alternativa de remetilación de homocisteína podría ser más sensible a la hiperhomocisteinemia y/o al agotamiento del grupo metilo (SAM) como resultado de la deficiencia de folato y/o vitamina B₁₂ (Bolander-Gouaille C, Bottiglieri). Los niveles de SAM en el líquido cefalorraquídeo son significativamente menores en, por ejemplo, pacientes de enfermedad de Alzheimer y depresión. A la inversa, el tratamiento con SAM mejoró la función cognitiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Así, Fusco A. y cols (Fusco y Scarpa, 2011) publicaron en 2011 una revisión en la que se expone la correlación entre Alzheimer y niveles de homocisteína comparando con sujetos sanos. Posteriormente, en 2014, se publicaron dos investigaciones que apuntan en la misma

dirección. En una de ellas Kim H. (Kim et al., 2014) informa de una significativa correlación positiva entre niveles de homocisteína y la valoración de síntomas asociados con la enfermedad (la correlación negativa respecto a los niveles de vitamina B₁₂ es también interesante). El trabajo de Zheng A. y cols. (Zheng et al., 2014) centra su estudio en una población de enfermos de Alzheimer a los que divide en dos grupos en función de que muestren síntomas conductuales y psicológicos asociados con la enfermedad y los que no muestran estos síntomas y concluye que, dentro de los pacientes de Alzheimer, aquéllos que muestran síntomas conductuales y psicológicos tienen niveles de homocisteína significativamente mayores que aquellos pacientes que no presentan esos síntomas. A la vista de estos resultados, cabe sugerir que no sólo la homocisteína forma parte del mecanismo etiológico de la enfermedad, sino que el nivel de hiperhomocisteinemia es determinante en la severidad de la enfermedad. En algunos estudios se ha demostrado que la SAM tiene también actividad antidepresiva, con resultados comparables a los antidepresivos tricíclicos estándar (Papakostas et al., 2012; Bressa, 1994). Los pacientes con depresión presentan niveles inferiores de folato en plasma y que algunos casos de depresión se resuelven por suplementación de folato (Mattson y Shea, 2003). También ha mostrado ser efectivo en la depresión relacionada con el Parkinson (Di Rocco et al., 2000).

Sin embargo, no está del todo establecido si este desequilibrio del ciclo de un carbono es una causa o una consecuencia de la enfermedad psiquiátrica o un epifenómeno. Una ingesta insuficiente inducida por la enfermedad o por dieta puede provocar deficiencias causando una desregulación bioquímica. Sin embargo, si la desregulación fuese sólo consecuencia de la enfermedad psiquiátrica, sin relación causal, entonces sería de esperar que la suplementación de nutrientes restaurase el normal metabolismo de un carbono sin impacto sobre los síntomas psiquiátricos, mientras que los ensayos clínicos muestran mejorías significativas de los síntomas (Beydoun et al., 2014).

Un obstáculo importante en el estudio de los desequilibrios bioquímicos en enfermos psiquiátricos es la falta de acceso a tejido cerebral *in vivo*; las células periféricas y los metabolitos plasmáticos pueden no replicar la situación en el cerebro. Un hallazgo importante es que el folato plasmático se correlaciona con folato en el líquido cefalorraquídeo en humanos. Además, trabajos realizados en porcino muestran que la

actividad de la metionina sintasa se correlaciona estrechamente con la ratio cerebral de SAM/SAH, aunque todavía no son del todo concluyentes. Sin embargo, numerosos ensayos clínicos han demostrado que aliviar las deficiencias de varios factores de metilación tiene un efecto significativo sobre los síntomas psiquiátricos, lo que apoya la hipótesis de que la perturbación de los niveles plasmáticos de metabolitos del ciclo de un carbono refleja una perturbación en el metabolismo del metilo cerebral que se presenta como síntoma psiquiátrico (Ansari et al., 2015).

Dicho esto, parece evidente que todos los pacientes deberían ser testados y tratados antes de la terapia farmacológica. Para un subgrupo de pacientes depresivos, este tratamiento podría ser suficiente y, para los otros, podría mejorar su respuesta a los antidepresivos. Sin embargo, deben determinarse los niveles óptimos de suplementación ya que tampoco están claros los efectos que podría tener la sobremetilación. En el caso de la población esquizofrénica, la alta prevalencia de enfermedad cardiovascular en este colectivo confirma la importancia de monitorizar los niveles plasmáticos de homocisteína en estos pacientes; la reducción de los niveles de homocisteína a través de la dieta mejora los síntomas psiquiátricos en esta población (Sudgen, 2006).

1.5.9. Interacciones entre la homocisteína, el ciclo de metilación y los mecanismos fisiopatológicos en EM

Como ya hemos visto en puntos anteriores, la EM es una enfermedad desmielinizante inflamatoria autoinmune del sistema nervioso central en la que una interacción entre factores genéticos y ambientales podría desencadenar el proceso inflamatorio. Se ha observado hiperhomocisteinemia en pacientes con EM, pero no parece estar relacionada con la activación autoinmune, el estrés oxidativo o una deficiencia en B₆, B₁₂ o folato, lo que indica un papel de la hiperhomocisteinemia en la patogénesis de la EM. Las neuronas podrían ser especialmente susceptibles a la excitotoxicidad inducida por hiperhomocisteinemia ya que ésta compromete la disponibilidad de metionina, y del donante del grupo metilo SAM, esencial en muchos procesos bioquímicos. La

hipometilación de la proteína básica de mielina podría resultar en estructuras de mielina menos estables que son susceptibles de degeneración (Ansari et al., 2015).

Se han encontrado niveles de homocisteína significativamente mayores en pacientes con EM respecto a controles sin que hubiera deficiencia de B₁₂ o folato y en ausencia de mutación MTHFR. En EM, la hiperhomocisteinemia se correlaciona con progresión clínica de la enfermedad, empeoramiento de la función cognitiva, de la atención visual y de la memoria visual-espacial comparando con pacientes con EM con homocisteína normal (Ansari et al., 2015).

Zhu et al. (Zhu et al., 2011) realizaron el primer metaanálisis para evaluar la asociación entre los niveles séricos de homocisteína, vitamina B₁₂, folato y la EM. La principal observación es que la EM está asociada con niveles elevados de homocisteína, con una correlación significativa estadísticamente y, probablemente, también desde el punto de vista clínico. Se advierte también de que estos datos deben tomarse con cautela debido a la heterogeneidad observada entre los estudios incluidos en el metaanálisis.

De igual forma, se encontró una diferencia significativa en los niveles séricos de vitamina B₁₂, siendo menores en individuos con EM que en los controles. Sin embargo, los resultados del metaanálisis sobre el folato no son concluyentes debido a los pocos estudios incluidos, aunque una alta proporción de pacientes con EM tendía a mostrar niveles de folato menores que los controles. En cualquier caso, los resultados sugieren una relación entre niveles elevados de homocisteína y la EM (Zhu et al., 2011).

La vitamina B₁₂ actúa como cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa, enzima que cataliza la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA, que puede entrar en el ciclo de Krebs. La deficiencia de vitamina B₁₂ produce deficiencia de metionina, lo que afecta a la síntesis tanto de fosfolípidos como de mielina. A su vez, la homocisteína es producida desde metionina y eliminada por su conversión a cisteína o por remetilación a metionina. La primera requiere vitamina B₆ como cofactor y la segunda vitamina B₁₂ y folato. Por lo tanto, una deficiencia en alguna de esas vitaminas puede causar elevaciones de la homocisteína plasmática.

Los mecanismos por los que la homocisteína puede actuar sobre la EM los podemos resumir en los siguientes puntos:

- a. Niveles elevados pueden significar una menor disponibilidad de metionina. La S-adenosilmetionina es un importante donante de grupos metilo en muchas reacciones de metilación que son importantes para la homeostasis neuronal (Ramsaransing et al., 2006). La metilación de la proteína básica de mielina (PBM)-arginina es importante para la hidrofobicidad de esta proteína, y por lo tanto influencia la estabilidad de la mielina durante la desmielinización y remielinización. La hipometilación de la PBM-arginina reduce el carácter hidrofóbico de la PBM, desestabilizando las estructuras de mielina y permitiendo la degeneración de la vaina de mielina (Bolander-Goualle y Bottiglieri, 2003).
- b. Estudios in vitro demuestran que la homocisteína puede inducir neurotoxicidad a través de la sobreestimulación de los receptores de N-metil-D-aspartato, lo que provoca daño neuronal debido al flujo excesivo de Ca^{2+} y la formación de especies reactivas de oxígeno. Además, el daño oxidativo producido por la generación de radicales libres mediada por la homocisteína podría ser neurotóxico (Sibarov et al., 2016).
- c. La homocisteína podría sensibilizar a los pacientes a los mecanismos inmunológicos de la EM porque influencia la respuesta de los linfocitos T y B, los *natural killers*, las citoquinas y las moléculas de adhesión (Leblhuber et al., 2000; Obeid et al., 2007). De este modo, pequeños aumentos en los niveles de homocisteína podrían tener importantes consecuencias para el SNC en la EM.
- d. En la EM, la hiperhomocisteinemia se correlaciona con progresión clínica y empeoramiento de la función cognitiva (Ansari et al., 2014; Rangel Oliveira, 2018).

2. Hipótesis y Objetivos

La hipótesis general de este estudio es que los hábitos dietéticos tienen una influencia en la evolución de los pacientes con EM. Aunque los datos publicados hasta hoy son en algunos casos contradictorios y no han permitido marcar unas pautas dietéticas y nutricionales en el contexto del manejo de la enfermedad, resultados previos sugieren que ciertas directrices nutricionales podrían modificar algunos parámetros bioquímicos impactando positivamente en la evolución y pronóstico de la enfermedad.

Así, teniendo en cuenta que los niveles de homocisteína son mayores en pacientes con EM que en población sin esta enfermedad y que, al igual que para la población en general, el nivel de homocisteína puede reducirse mediante la implementación de unas pautas dietéticas que restrinjan el consumo de alimentos procesados, ricos en azúcar y sal y de alta densidad calórica, aseguren una importante ingesta de ácido fólico, vitamina B₁₂, vitamina D, ácidos grasos poliinsaturados, y limiten la ingesta calórica total, proponemos como hipótesis principal de este estudio que la reducción del nivel de homocisteína tiene un efecto positivo y medible en la calidad de vida de los pacientes.

Para la validación de esta hipótesis, se establecen los siguientes objetivos:

- Establecer si los pacientes con EM presentan niveles de homocisteína mayores a los del resto de la población.
- Implementar unas pautas dietéticas que, en base a los estudios existentes hasta la fecha, permitan disminuir los niveles de homocisteína de estos pacientes.
- Reducción del índice de masa corporal en aquellos pacientes que presenten sobrepeso u obesidad.
- Monitorizar otros parámetros bioquímicos para establecer diferencias basales respecto a la población general y evolución de estos a lo largo del estudio.
- Establecer posibles diferencias en niveles de parámetros bioquímicos en función de la línea de tratamiento.
- Evaluar mediante la EDSS la evolución de la enfermedad en la muestra de pacientes.

- Establecer correlaciones entre variación de homocisteína y cambios dietéticos en los pacientes.
- Establecer recomendaciones dietéticas a incluir en el tratamiento de estos pacientes.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reclutamiento de pacientes y controles

El proceso de selección se realizó entre los pacientes tratados en la consulta de esclerosis múltiple del servicio de Neurología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Esta consulta atiende alrededor de 450 pacientes de toda la provincia de Salamanca. A los pacientes que cumplían los criterios para poder participar se les informaba en la misma consulta sobre el protocolo y objetivos del estudio.

Se reclutaron 41 pacientes, 75% mujeres y 25% hombres, que representaban un 9% de los pacientes atendidos entonces en la consulta. La mayoría de los pacientes disponía de residencia en Salamanca capital o en municipios cercanos y mostraron una actitud colaborativa al inicio del estudio.

Los pacientes, que acuden a la consulta de neurología cada 6 – 12 meses, eran informados del estudio y se les daba la posibilidad de llamar a la consulta de nutrición cuando ellos considerasen oportuno. Este proceso de reclutamiento, desde que se empezó a informar a los pacientes hasta que acudió a consulta de nutrición el último paciente reclutado, se alargó hasta los 2 años y medio.

3.2. Consultas de nutrición

Los pacientes que aceptaron participar en el estudio acudieron a una primera visita en la consulta de nutrición donde se les explicaba el objetivo y protocolo del estudio y firmaban el consentimiento informado. La frecuencia de las visitas se estableció en función de que hubiera objetivo de variación de peso o no, de los hábitos dietéticos de partida y de la disponibilidad del paciente, pudiendo variar entre consultas semanales a consultas mensuales. En total, los 41 pacientes acudieron a 673 consultas a lo largo de 3 años y medio.

En la primera consulta se les realizó el cuestionario de ingesta de 24h y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos. También se les entregó un diario dietético en el que apuntar todas las ingestas realizadas durante la semana siguiente y que debían entregar cumplimentado en la segunda visita. Todos estos datos se utilizaron para las evaluaciones de consumo de grupos de alimentos utilizadas en el estudio y para detectar posibilidades nutricionales de mejora, además de permitir un conocimiento detallado de los hábitos y gustos del paciente para un diseño de la dieta totalmente personalizado. En la primera consulta también se midió peso, talla y perímetro de muñeca para cálculo de complejión. Se evaluó su actividad física para el cálculo del gasto energético total utilizando la fórmula de Harris-Benedict (Gil Hernández, 2010). Con estos datos, se fijaron los objetivos de peso y la frecuencia inicial de las consultas.

En la segunda consulta, con los datos recopilados en la primera y los del registro dietético, se les pautó la primera dieta. Las características de las dietas pautadas se explicarán el apartado 3 de este capítulo. En todas las consultas posteriores se procedió a la medición del peso y a la evaluación del seguimiento de la dieta anterior. Después, se revisaba la dieta con la finalidad de mejorar la adherencia, mejorar resultados o para variar los menús y evitar la monotonía, pero siempre dentro de los criterios establecidos para cada paciente.

3.3. Dietas implementadas

Todas las dietas pautadas se diseñaron de forma personalizada teniendo en cuenta, por una parte, hábitos dietéticos del paciente, gustos, objetivo de peso y, por otra parte, los criterios generales establecidos para el estudio.

Los criterios generales que se establecieron para el estudio fueron los siguientes:

- Maximizar la ingesta de verduras, con un mínimo de una ración diaria, adecuándola a los gustos del paciente, pero primando siempre la mayor variedad posible tanto en tipo de verdura como en su forma de preparación (cocidas, rehogadas, asadas, a la plancha, crudas en ensalada...).

- Se estableció una rutina de ingesta de hidratos de carbono. Los menús diarios presentaban un plato rico en hidratos de carbono en días alternos aproximadamente. Siempre que no hubiese algún factor que lo impidiese, las legumbres debían estar presentes todas las semanas, así como 2 o 3 días de pasta, arroz, cous-cous o preparaciones con patata. Además, todos los pacientes contaban con raciones de pan distribuidas a lo largo del día (desayuno, comidas principales y colaciones intermedias).
- Se estableció una pauta de ingesta de proteínas a base de carnes magras (pollo, pavo, conejo, partes magras de ternera y, del cerdo, lomo y solomillo), pescados (al menos 3 raciones a la semana con especial atención a que no faltasen pescados azules), y huevos (tortillas, revueltos o cocidos). La pauta de ingesta de proteínas debía realizarse con una frecuencia total de 1 o 2 raciones al día.
- Se pautó la eliminación (o al menos reducción al mínimo) de alimentos menos recomendables nutricionalmente, como alimentos procesados, azucarados, bollería, galletas, embutidos, derivados cárnicos procesados, refrescos azucarados, bebidas alcohólicas, así como preparaciones culinarias que aumentasen la carga calórica del menú.
- Se pautó la ingesta de frutas y de lácteos.
- Para mejorar la adherencia a la dieta, se tuvieron en cuenta también los condicionantes propios del paciente, como turnos de trabajo, menús especiales de fin de semana, vacaciones o festejos, rutinas familiares, actividades deportivas, etc.

A continuación, se presentan algunos ejemplos comentados de las dietas prescritas:

- Ejemplo 1 (Figura 6): dieta prescrita para una paciente con objetivo de pérdida de peso. Las comidas cuentan con 5 días de primeros platos de verduras, 4 de ellos verduras cocinadas, y 2 días con menú de platos ricos en hidratos de carbono, uno de ellos legumbre y, el otro, pasta. Se distribuye pan en desayuno, comida y merienda, este último en forma de sándwich. Las cenas cuentan todas con al menos una guarnición de verdura. Se pautan carnes magras (salvo la carne de la pasta), pescados (2 cenas además del empleado en conserva en las ensaladas) y huevos (4 huevos en la semana).

	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
1461 Kcal Desayuno 225 Kcal. 22.37%	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas aceite de oliva o mermelada
Media Mañana 105 Kcal. 4.87%	Fruita	Fruita	Fruita	Fruita	Fruita	Fruita	Fruita
Comida 360.7 Kcal. 35.86%	Coliflor o Brócoli Filetes de lomo (2) 100g Pan 30g, 1 rebanada Fruita	Pasta 200g con gambas Carné picada 80g Pan 30g, 1 rebanada Fruita	Aceitunas o Espinacas Filetes de lomo (2) 100g Pan 30g, 1 rebanada Fruita	Crema de Verduras Pechuga de pollo a la plancha 100g Pan 30g, 1 rebanada Fruita	Lentejas 200g con verduras	Verduras salteadas o a la plancha Filete de ternera a la plancha 100g Pan 30g, 1 rebanada Fruita	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) Pollo asado 100g Pan 30g, 1 rebanada Fruita
Merienda 225 Kcal. 22.37%	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo	Pan 60g, 2 rebanadas Jamón, Fiambre o Lomo
Cena 241.1 Kcal. 23.96%	Espárragos, pimientos, trigüeros, tomate... Tortilla francesa 2h Yogur	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) 1 latita de atún Yogur	Espárragos, pimientos, trigüeros, tomate... Pescado blanco a la plancha 100g Yogur	Espárragos, pimientos, trigüeros, tomate... Pescado azul a la plancha 100g Yogur	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) Salmón y Queso Fresco Yogur	Sandwich (pan 60g) vegetal o de atún Pan 60g, 2 rebanadas Yogur	Espárragos, pimientos, trigüeros, tomate... Revuelto de champiñones o ajetes o gambas 2h Yogur

Figura 6: Dieta ejemplo 1.

	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
1246 Kcal							
Desayuno 190 Kcal. 15.37%	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada
TURNO 187.5 Kcal. 15.21%	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada Jamón, Fiambre o Lomo
Comida 307.1 Kcal. 31.47%	Pasta 200g con tomate	Judías verdes Filetes de lomo (2) 100g	Lentejas 200g con verduras	Brócoli Pechuga de pollo a la plancha 100g	Crema de Verduras Filete de ternera a la plancha 100g	Patatas guisadas con pescado (250g)	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) Pollo asado 100g
CASA 87.6 Kcal. 8.97%	Café o Infusión Fruta	Café o Infusión Fruta	Café o Infusión Fruta	Café o Infusión Fruta	Café o Infusión Fruta	Café o Infusión Fruta	Café o Infusión Fruta
Cena 244.6 Kcal. 25.07%	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) 1 latita de atún Yogur	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate... Pescado blanco a la plancha 120g Yogur	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) 1 latita de atún Yogur	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate... Pescado azul a la plancha 100g Yogur	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate... Tortilla de calabacín y cebolla 2h Yogur	Libre Yogur	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate... Tortilla francesa 2h Yogur

Figura 7: Dieta ejemplo 2.

	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
1517 Kcal							
Desayuno 320 Kcal. 33.2%	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi	Café con Leche Pan 60g, 2 rebanadas Aceite o Mermelada Kiwi
Media Mañana 50 Kcal. 5.19%	Fruta o Café	Fruta o Café	Fruta o Café	Fruta o Café	Fruta o Café	Fruta o Café	Fruta o Café
Comida 339.3 Kcal. 35.2%	Legumbres 250g con verduras	Verdura cocida, rehogada, salteada, plancha, Menestra, Puré Pechuga de pollo a la plancha 120g Pan 30g, 1 rebanada	Pasta o Arroz 300g Came picada o Atún o Huevo o Marisco... Pan 30g, 1 rebanada	Verdura cocida, rehogada, salteada, plancha, Menestra, Puré Filete de ternera a la plancha 100g Pan 30g, 1 rebanada	Came (100g) guisada con patatas (200g) y verduras Menestra con carne y patata	Verdura cocida, rehogada, salteada, plancha Came picada o Atún o Huevo o Marisco... Pan 30g, 1 rebanada	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) Pollo asado o guisado 100g Pan 30g, 1 rebanada
Merienda 50 Kcal. 5.19%	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta
Cena 391.1 Kcal. 40.57%	Espárragos, tomate, pimientos, caldo... Sandwich (pan 60g) vegetal o de atún (Pan 60-80g) Yogur	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate... Pescado blanco a la plancha 120g Pan 30g, 1 rebanada Yogur	Espárragos, tomate, pimientos, caldo... Tortilla o Revuelto 2h Pan 30g, 1 rebanada Yogur	(Patata o Pasta o Arroz 100g) Espárragos, pimientos, trigueros, tomate... Pescado azul a la plancha 100g Pan 30g, 1 rebanada Yogur	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...) Salmón, aguacate, queso fresco, frutos secos, atún... (libre) Pan 30g, 1 rebanada Yogur	Libre Pan 30g, 1 rebanada Yogur	Espárragos, tomate, pimientos, caldo... Tostas de guacamole, hummus... (Pan 60-80g) Yogur

Figura 8: Dieta ejemplo 3

Desayuno 150 Kcal. 19.97%	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada	Café con Leche Pan 30g, 1 rebanada aceite de oliva o mermelada
Media Mañana 50 Kcal. 6.66%	Infusión Fruta	Infusión Fruta	Infusión Fruta	Infusión Fruta	Infusión Fruta
Comida 307 Kcal. 40.18%	Lentejas o Garbanzos 200g con verduras	Judías verdes o Alcachofas	Crema de Verduras	Repollo	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...)
	Brócoli o Coliflor	Pechuga de pollo a la plancha 100g	Filetes de lomo (2) 100g	Pollo o Pavo a la plancha 120g	Pollo asado o guisado 100g
	Filetes de lomo (2) 100g	Pan 20g Fruta	Pan 20g Fruta	Pan 20g Fruta	Pan 20g Fruta
Merienda 50 Kcal. 6.66%	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta
Cena 244.6 Kcal. 31.58%	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...)	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate...	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate...	Ensalada (canónigos, lechuga, tomate, cebolla, espárragos, pimiento, rúcula, zanahoria...)	Espárragos, pimientos, trigueros, tomate...
	1 latita de atún Yogur	Pescado blanco a la plancha 100g Yogur	Pescado azul a la plancha 100g Yogur	1 latita de atún Yogur	Tortilla francesa 2h Yogur

Figura 9: Dieta ejemplo 4.

- Ejemplo 2 (Figura 7): dieta semanal con menús concretos y en contexto de objetivo de reducción de peso. Incluye 3 días con menús ricos en hidratos de carbono (pasta, lentejas y patatas con pescado), 3 días de verdura cocinada (judías verdes, brócoli y crema de verduras) con segundos de carne magra a la plancha, y 1 día de pollo asado con ensalada. Como la paciente trabaja a turnos, la dieta incluye un pequeño bocadillo durante el turno de trabajo. Las cenas las componen 2 días de pescado, 2 días de ensaladas con atún y 2 días de huevo (tortilla francesa y tortilla de calabacín).
- Ejemplo 3 (Figura 8): dieta con objetivo de mantenimiento de peso, con 3 días de hidratos de carbono que incluyen un día de legumbres, uno de pasta o arroz y un de un plato con patata en forma de guiso de carne con patatas o menestra. Se alternan días de verdura cocinada con un segundo de carne magra y un día de carne también magra asada o guisada. El desayuno es un poco más fuerte que los anteriores, con una buena ración de pan y fruta, pero las colaciones intermedias, de media mañana y merienda, son ligeras, a base de café con leche o fruta. Las cenas incluyen días con un aporte calórico mayor, con sándwich, tostas, guarnición de pasta, arroz o patata un día de pescado, y una ensalada más completa con libertad de añadirle aguacate, salmón, queso, etc.
- Ejemplo 4 (Figura 9): ejemplo de dieta más baja en hidratos de carbono, con sólo un día de legumbres y 5 días de verdura cocida, rehogada o salteada acompañada de un segundo de carne magra. Cenas sencillas, con dos días de pescado (en total unos 200g de pescado azul a la semana).

3.4. Mediciones, analíticas y software

- Las mediciones de peso y talla se realizaron con una báscula con tallímetro Tanita WB3000 con precisión $\pm 100g$.
- El tratamiento estadístico de datos se hizo con el software Minitab v19.
- Las analíticas se realizaron en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y contamos con un total de 123 analíticas para la realización de este estudio.
- La valoración de la EDSS se realiza de forma rutinaria en la consulta de neurología por lo que se toma, para cada paciente, las valoraciones más cercanas en el

tiempo a cada una de las analíticas. En el apartado siguiente se describe esta escala.

3.5. Evaluación de la EDSS

La escala de discapacidad EDSS (Expanded Disability Status Scale) (Kurtzke, 2008) es la escala más conocida y utilizada para la evaluación de la afectación neurológica que se obtiene a partir de la exploración de 8 sistemas funcionales (piramidal, cerebeloso, troncoencefálico, sensitivo, esfinteriano, visual, mental y “otros”). La puntuación final es un número entre el 0-10 con intervalos de 0.5 puntos, siendo 0 la puntuación para un paciente con exploración normal y 10 para un paciente fallecido por EM. Los puntos clave de la escala son el 3 (discapacidad moderada en un sistema funcional), el 4 (limitación para la deambulacion sin apoyos), el 6 (necesidad de un apoyo constante), 6.5 (necesidad de apoyo bilateral) y 7 (limitado a silla de ruedas). A partir de 8.5 puntos el paciente está limitado a permanecer encamado.

3.6. Líneas de tratamiento

3.6.1. Primera línea

- A. Interferon beta SC: existen cuatro formulaciones aprobadas para la EM con eficacia contrastada en diferentes ensayos clínicos tanto en EMRR como en primer brote y CIS. Recientemente se ha aprobado su uso durante el embarazo y la lactancia. Su mecanismo de acción real es desconocido, y su uso inicial derivó de la hipótesis de que la EM estaba producida por una infección viral. Entre ellos se diferencian en la forma y frecuencia de administración.
- B. Acetato de glatirámico 40 mg SC: (Copaxone®) Es una molécula con propiedades inmunomoduladoras, aunque al igual que los interferones su mecanismo de acción no es bien conocido. Se creía que actuaba compitiendo con la proteína básica de la mielina por los lugares de unión a las moléculas HLA-II, pero probablemente su mecanismo es más complejo. Reduce la tasa de brotes en aproximadamente un 30%. Es un fármaco en general bien tolerado y sus efectos

adversos se circunscriben básicamente a las reacciones locales secundarias a la inyección.

- C. Teriflunomida 14 mg oral (Aubagio®): Se trata de una molécula aprobada recientemente en la EMRR. Actúa bloqueando la síntesis de novo de las pirimidinas, produciendo un efecto citostático sobre la proliferación de linfocitos T y B en el contexto de la activación. El fármaco se administra vía oral, una vez al día, con o sin alimentos, y su efecto adverso más importante es la elevación de las transaminasas.
- D. Dimetilfumarato 120 ó 240 mg oral (Tecfidera®): Es un derivado del ácido fumárico, y aunque su mecanismo último no es bien conocido, se le atribuyen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Reduce la tasa de brotes en torno a un 50%.
- E. Azatioprina 50 mg oral (Imurel®): Es un inmunosupresor no específico análogo de la purina, con datos de eficacia en un metaanálisis que le confiere un grado de evidencia C. No tiene efectos beneficiosos sobre la discapacidad. Sus efectos adversos más frecuentes son leucopenia, infecciones oportunistas, y un posible riesgo aumentado de neoplasias tras diez años de tratamiento.

3.6.2. Segunda línea

- A. Natalizumab 300 mg IV (Tysabri®): es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe la adhesión al endotelio e impide la migración de los linfocitos activados a través de la barrera hematoencefálica. Reduce la tasa de brotes en cerca de un 70%. En 2006 se aprobó como terapia de segunda línea en pacientes EMRR que no responden al interferón, o como primera línea en formas grave de evolución rápida.
- B. Fingolimod 0,5 mg oral (Gilenya®): modula el receptor de esfingosin-1-fosfato promoviendo su internalización en la célula y evitando (“secuestrando”) la salida de linfocitos activados de los nódulos linfáticos a la circulación sanguínea. Reduce de la tasa de brotes en un 54 %.
- C. Alemtuzumab 14 mg oral (Lemtrada®): es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el antígeno CD52 de los linfocitos T y B produciendo

prolongada depleción de éstos seguida por una repoblación diferente de estas células, rebalanceando el sistema inmune. Reduce la tasa de brotes en un 75%. Los efectos más comunes asociados con alemtuzumab han sido reacciones infusionales, y la aparición de enfermedades autoinmunes hasta 4 años después del tratamiento.

- D. Cladribina 10 mg oral (Mavenclad®): La cladribina es un análogo nucleósido de la desoxiadenosina, que induce la apoptosis del Cd-ATP, ejerciendo acciones directas e indirectas sobre la síntesis de DNA y la función mitocondrial. Aunque su mecanismo no está totalmente esclarecido, se cree que su efecto predominante sobre los linfocitos B y T interrumpe la cascada de eventos inmunitarios centrales en la EM, reduciendo la tasa de brotes de forma estadísticamente significativa. Los efectos secundarios más importantes fueron la linfopenia y el aumento de la frecuencia de infecciones. La incidencia de neoplasias fue similar a la de la población general de referencia
- E. Ocrelizumab 300 mg IV (Ocrevus®): es un anticuerpo monoclonal humanizado que depleciona de forma selectiva los linfocitos B CD20+. Su eficacia en la EMRR se traduce en una disminución de la tasa anualizada de brotes del 47% frente a interferón beta como comparador activo, con disminución importante de la actividad inflamatoria en los parámetros de RM. Sus efectos secundarios más frecuentes fueron las reacciones perfusionales, sin que haya presentado otros problemas importantes de seguridad en la actualidad.
- F. Rituximab 500 mg IV (Truxima®): es un anticuerpo monoclonal murino-humano dirigido contra el antígeno CD20 presente en los linfocitos pre-B y B maduros, cuyo uso está descrito fuera de indicación en diferentes enfermedades autoinmunes, entre ellas la EM.

3.6.3. Criterios de cambio de línea de tratamiento

El tratamiento es controlado de forma periódica cada 3-4-6 meses en función de las características de cada paciente, momentos en los que se determina la puntuación según la escala de discapacidad EDSS, el número y la gravedad de los brotes (si los hubiere) y el número y la gravedad de las lesiones en RMN. En los pacientes que

requieran segunda línea de tratamiento se realizará la serología de virus JC y el índice de anticuerpos. En pacientes seleccionados pueden requerirse otras determinaciones (bandas IgM en LCR, etc) de cara a estratificar el riesgo de utilización de los tratamientos de segunda línea. La duración del tratamiento de inicio será indefinida mientras se mantenga la eficacia y seguridad del fármaco empleado. Serán criterios de cambio de medicamento dentro de la primera línea:

- El deseo gestacional (en pacientes que utilizan fármacos contraindicados durante el embarazo, y requieran el mantenimiento de tratamiento).
- La aparición de lesiones cutáneas (en pacientes con fármacos inyectables) u otros efectos adversos graves (disfunción tiroidea, hepatopatía, gastropatía, depresión, etc...).

Son criterios de cambio de primera a segunda línea:

- La respuesta subóptima: tasa de brotes superior a la esperada por los resultados obtenidos en los ensayos clínicos de los tratamientos modificadores de la enfermedad. Presencia de lesiones activas en RMN sin brotes clínicos en el último año.
- El fallo terapéutico: dos o más brotes clínicos en un año o bien 1 brote clínico y actividad radiológica o incremento significativo de la carga lesional por RMN.
- La aparición de un brote catastrófico.

Se podrá plantear cambio de 2ª a 1ª línea (INF beta o acetato de glatirámico) como terapia puente para gestación y lactancia, en el caso de fármacos contraindicados durante el embarazo, en pacientes con enfermedad activa.

3.7. Escala de frecuencia de consumo de alimentos

Para evaluar los hábitos nutricionales de los pacientes al inicio del estudio y poder compararlos con los adquiridos durante el estudio, se creó esta escala de frecuencia de consumo de alimentos. La misma escala se utilizó para la evaluación de los 3 grupos de alimentos clave: verduras, alimentos proteicos y alimentos no saludables.

El grupo de las verduras lo integran todas las verduras y hortalizas, crudas o cocinadas, y se consideró ingesta cuando ésta fue al menos un plato (ración) o una guarnición. Se incluyen todas las preparaciones culinarias, como cocidas, rehogadas, salteadas, a la plancha, cremas, purés, así como recetas cuyos ingredientes mayoritarios sean verduras como, por ejemplo, pisto o menestra.

En el grupo de alimentos proteicos se incluyeron aquéllos cuyas proteínas son consideradas de alto valor biológico, es decir, carnes y pescados magros no procesados y huevos. No se incluyen, a pesar de ser alimentos proteicos, los lácteos, legumbres y carnes o pescados procesados como, por ejemplo, salchichas, fiambres o derivados industriales de pescado.

El grupo de alimentos no saludables lo integraron, básicamente, alimentos especialmente ricos en grasas saturadas y alimentos azucarados, como por ejemplo embutidos, salchichas, snacks, bollería, galletas, productos de confitería, helados y bebidas azucaradas.

Se realizó la escala de frecuencia de consumo de estos alimentos según el siguiente criterio (Figura 10):

Frecuencia estimada	Puntuación
Nunca o consumo esporádico	1
1 o 2 raciones a la semana	2
Entre 3 y 5 raciones a la semana	3
Más de 5 raciones a la semana	4

Figura 10: Escala de frecuencia de consumo de alimentos

Debe señalarse el carácter cualitativo de la escala que, aun siguiendo criterios objetivos y basándose en la información recopilada con los distintos cuestionarios y registros, así como en las consultas, está sujeta a la incertidumbre inherente a estos métodos.

3.8. Escala de seguimiento / adherencia a la dieta

Se calificó el grado de cumplimiento de las dietas para posteriormente poder estudiar la variación de los parámetros en función del nivel de adherencia. La escala de seguimiento diseñada con este propósito puntúa según el siguiente criterio (Figura 11):

Descripción del seguimiento percibido	Puntuación
Mal seguimiento en todas o en la mayoría de las consultas	1
Seguimiento irregular, con aproximadamente la mitad de las consultas con percepción de buen seguimiento.	2
Buen seguimiento de la dieta todas o la mayoría de las consultas	3

Figura 11: Escala de seguimiento de la dieta

Como puede observarse por el criterio de calificación de la escala, la valoración se hace en función de la percepción del grado de seguimiento de la dieta. En los pacientes donde había un objetivo de variación del peso corporal, la valoración fue más sencilla ya que este parámetro medible nos indicaba si la adherencia a la dieta había sido buena desde la consulta anterior. En el resto de casos, la valoración se realizó según la entrevista de la consulta, por lo que no se dispone de un parámetro medible y, por lo tanto, en estos casos puede estar afectada por un mayor margen de error.

4. Resultados

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE PACIENTES Y CONTROLES

Este trabajo se basa en el estudio de la homocisteína y sus implicaciones en la variación de la afectación de la enfermedad en los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM). El estudio de la homocisteína implica un gran conocimiento y calificación de los hábitos nutricionales, así como de las vitaminas implicadas en el ciclo de eliminación de la homocisteína, como son el ácido fólico y la vitamina B₁₂. Se ha observado que puede existir una correlación entre el índice de masa corporal (IMC) y la homocisteína (De Bree et al, 2001). Con el objetivo de reducir los niveles de homocisteína, como agente modificador de la EM, en este estudio se plantea la medición y seguimiento del peso corporal. Además, se han introducido cambios en la dieta de los pacientes que podrían suponer variaciones de peso incluso cuando éste no fuese el objetivo, por lo que su monitorización es necesaria. Los cambios dietéticos pueden producir a su vez, modificaciones en otros parámetros bioquímicos, como es el caso del colesterol, la glucosa, los niveles de hierro, ferritina y transferrina, niveles de albúmina, creatinina y proteínas totales. La variación, si la hubiera, de estos parámetros a lo largo del estudio, junto con las diferencias que se pueden encontrar en función de la línea de tratamiento y otros determinantes a analizar, como las características de la dieta del paciente previa al estudio y su grado de adherencia a la dieta, han sido las variables que se han medido y analizado. Además, sin olvidar la evolución, en términos de EDSS, de los pacientes.

4.1.1. Edades y tamaño de la muestra de pacientes

Se reclutaron 41 pacientes, hombres y mujeres, con edades comprendidas entre los 21 y los 62 años. La media de edad de la muestra era de 40 años. La muestra contaba con 31 mujeres con edades comprendidas entre los 21 y los 62 años y 10 hombres con edades entre los 31 y los 58 años (Figura 12).

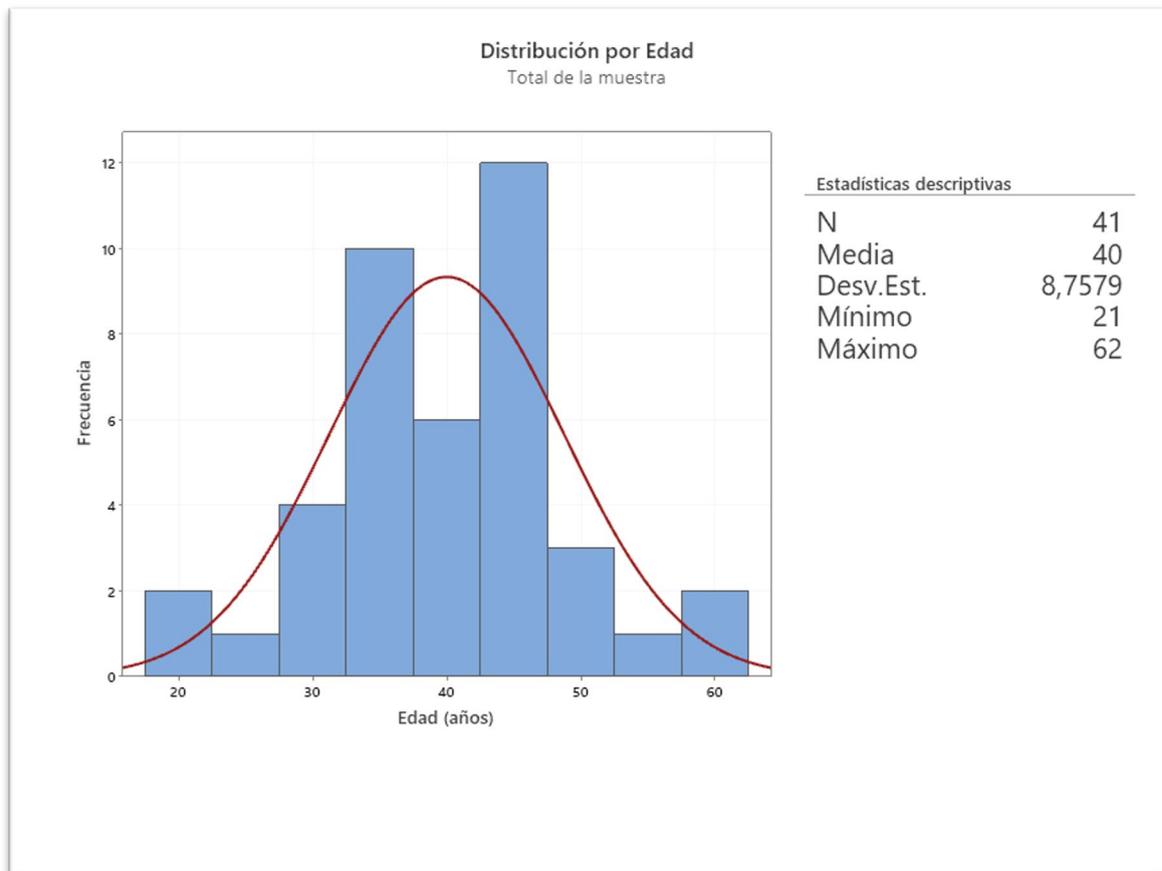


Figura 12: Histograma de edades de la muestra de pacientes.

El proceso de reclutamiento se realizó entre los pacientes que acuden a la consulta monográfica de esclerosis múltiple del servicio de Neurología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Esta consulta atiende a unos 450 pacientes con EM de la provincia, por lo que la muestra supuso reclutar acerca de un 10% de los pacientes con EM de la provincia por lo que, sin ser muy numerosa, sí es muy representativa de este colectivo de pacientes que comparten un mismo ámbito geográfico y una misma cultura gastronómica, lo que es fundamental para un estudio como éste. Las proporciones relativas de hombres y mujeres son similares a las de prevalencia por sexo de la enfermedad.

4.1.2. IMC

Al no haber un modelo claro que relacione EM con IMC y cómo la enfermedad afecta a dicho parámetro, se estudió el IMC de los pacientes durante el año de seguimiento para determinar si hay una relación.

El IMC de la muestra presenta una distribución asimétrica, con una media de 25,6 Kg/m² y una mayor presencia de pacientes con sobrepeso u obesidad (Figura 13). Sin embargo, también es importante el número de pacientes con un peso bajo o muy bajo. En la figura 13 se puede observar que cerca del 50% del total de la muestra presenta sobrepeso u obesidad y un 25% está en situación de peso bajo o muy bajo (con IMCs en torno a 20 Kg/m² o menores).

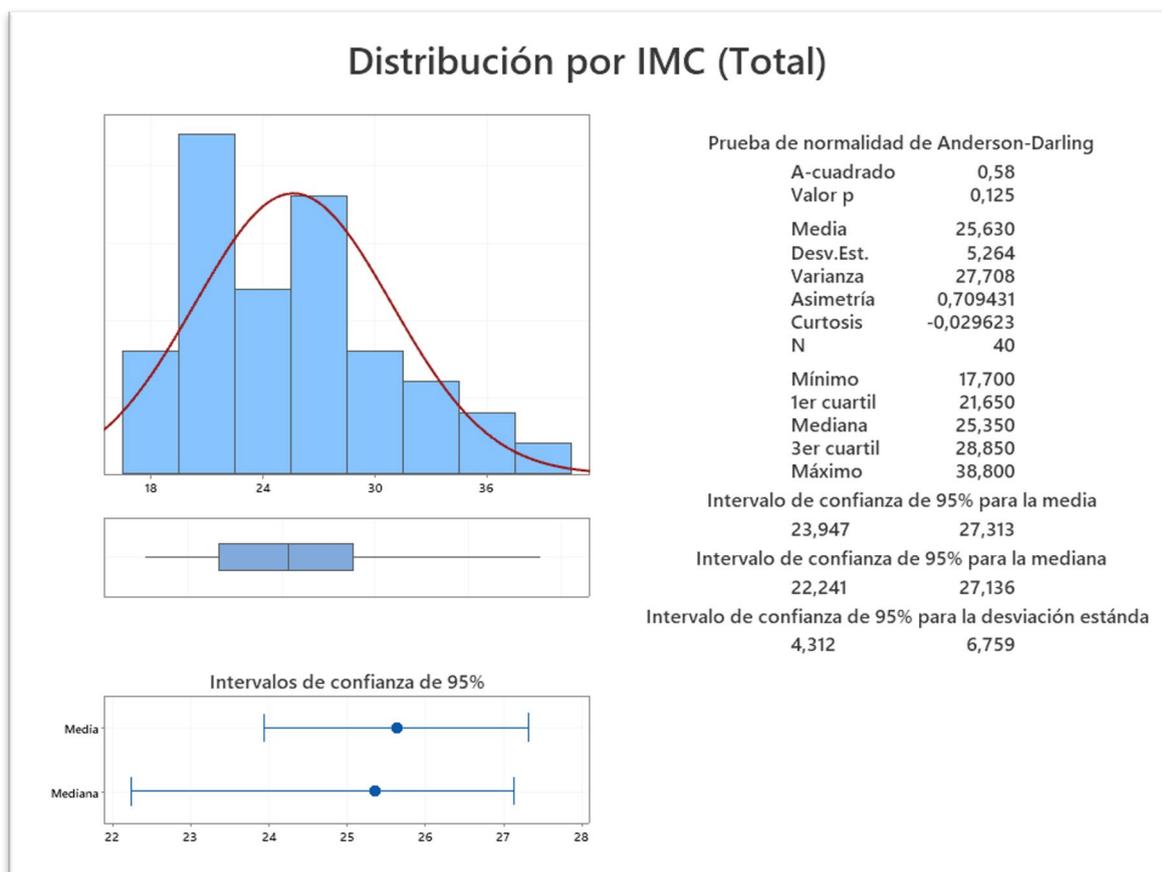


Figura 13: Distribución en función del IMC de la muestra y valores estadísticos descriptivos.

Aunque el IMC medio del grupo de mujeres es de 25,9 Kg/m², con un importante subgrupo de mujeres con sobrepeso u obesidad, también es llamativo también el alto porcentaje de mujeres con peso bajo o muy bajo.

El IMC del grupo de hombres es 24,8 Kg/m², relativamente alto, pero dentro del normopeso.

4.1.3. EDSS

La EDSS media del total de los pacientes es 1,14, con valores comprendidos entre 0 y 6, tal y como se puede apreciar en la figura 14.

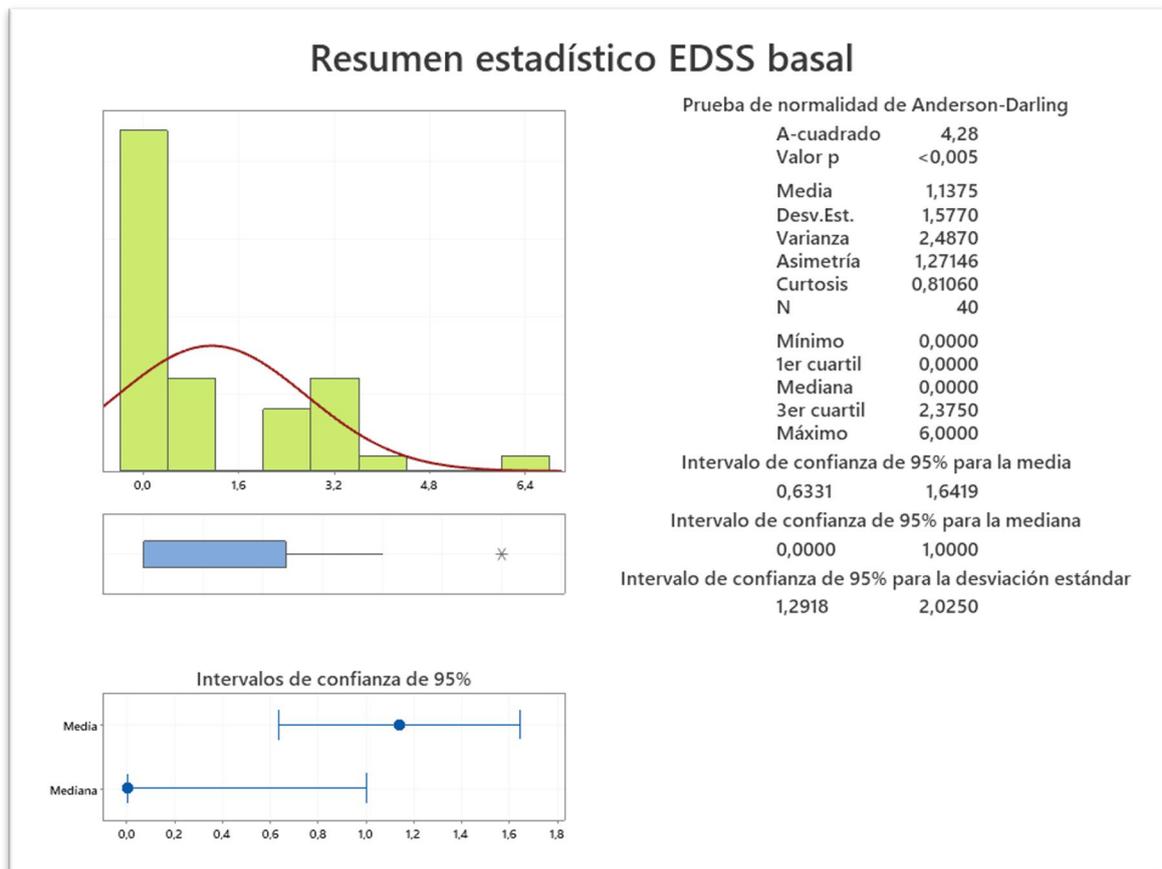


Figura 14: Resumen estadístico de los valores basales de la EDSS en la muestra de pacientes

4.1.4. Líneas de tratamiento

En cuanto al tratamiento médico seguido por los pacientes, 24 seguían tratamiento de 1ª línea y 16 pacientes de 2ª línea. Un paciente no tenía tratamiento (Figura 15).

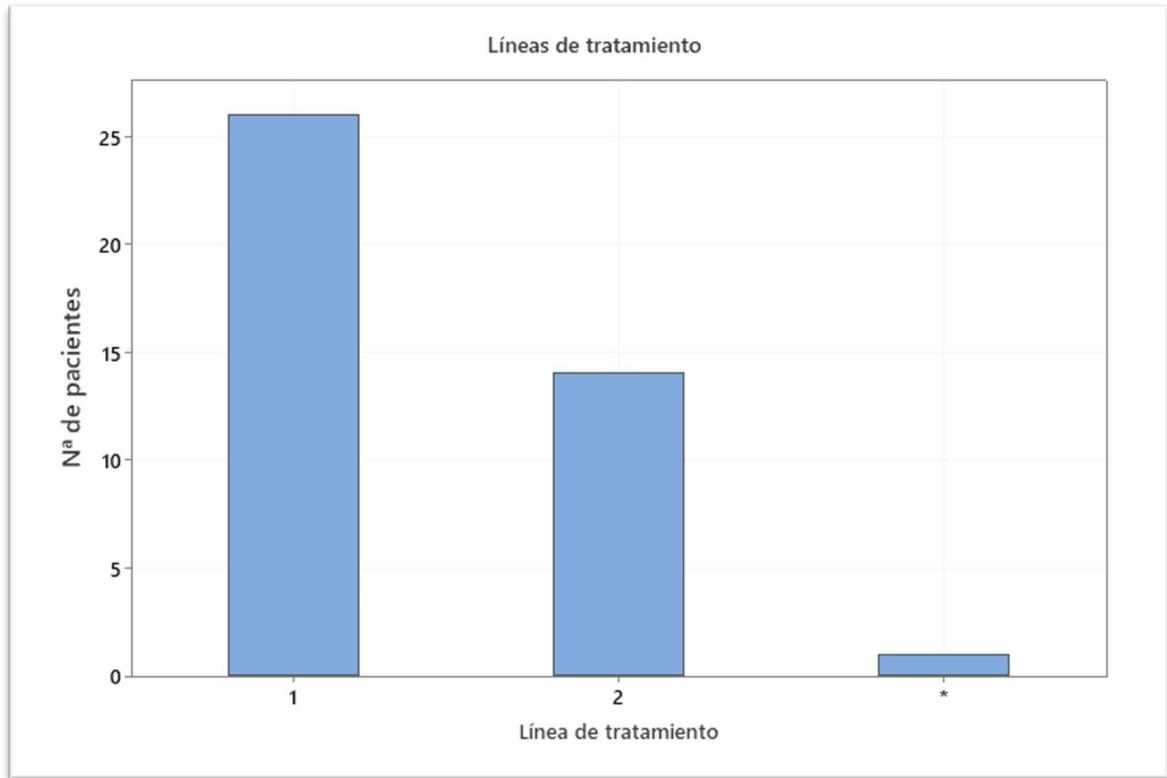


Figura 15: Histograma de pacientes agrupados por línea de tratamiento donde 1 indica pacientes con tratamiento de primera línea, 2 indica pacientes con tratamiento de segunda línea y * indica paciente sin tratamiento.

4.1.5. Hábitos dietéticos de la muestra de pacientes

Se ha observado que el estado nutricional podría influenciar el curso de la EM (Esposito et al, 2017; Schwarz y Leweling, 2005; Penesová et al, 2017; Redondo Robles, 2018). Sin embargo, la cuestión es cómo las moléculas de origen dietético pueden exacerbar o disminuir los síntomas y, en general, cómo podrían favorecer o reducir la inflamación a nivel molecular. En concreto, es importante clarificar cuáles son las dianas de las moléculas dietéticas y el mecanismo molecular relacionado.

En la EM, como en otras enfermedades inflamatorias crónicas, los componentes de la dieta que deben controlarse para evitar el aumento de los procesos inflamatorios en EM, así como en otras enfermedades inflamatorias crónicas, son los siguientes:

- Ácidos grasos saturados de origen animal
- Ácidos grasos insaturados *trans*
- Carne roja
- Bebidas azucaradas y, en general, dietas hipercalóricas ricas en hidratos de carbono refinados (y pobres en fibra).
- Ingestas elevadas de sal.
- Proteínas lácteas de las membranas de los glóbulos de grasa.

En relación con la homocisteína, se sabe que en altas concentraciones en personas mayores puede ser consecuencia de un enlentecimiento general del metabolismo. Así mismo, puede ocasionar un aumento de malabsorción intestinal o el insuficiente suministro nutricional de folato, vitaminas B₁₂ y B₆, disminuir la función renal y otros cambios fisiológicos relacionados con la edad, o estar asociado con enfermedades. Se ha observado que la distribución de vitaminas no es óptima en la mayoría de las personas mayores. La nutrición y el estilo de vida son factores importantes que determinan la homocisteína total y pueden, en gran parte, explicar por qué los valores medios de homocisteína total varían entre poblaciones.

Debido a las limitaciones metodológicas del estudio y considerando que el principal parámetro que nos proponemos estudiar es la homocisteína, se decidió realizar unas encuestas sobre el consumo de alimentos. Para ello, las preguntas se centraron en tres amplios grupos de alimentos cuyo mayor o menor consumo podrían tener un impacto directo sobre los niveles de homocisteína. En concreto, se valoró:

- El consumo neto de verduras, fuente principal de ácido fólico.
- El consumo de alimentos proteicos no grasos y no procesados, cuya ingesta se correlaciona con la ingesta de vitamina B₁₂ y hierro y cuyo consumo puede influir en diversos parámetros bioquímicos.
- El consumo de alimentos no saludables o no recomendables al tratarse de alimentos grasos, procesados, ricos en sal y/o ricos en azúcares refinados.

4.1.6. Consumo de verduras

En la figura 16 se aprecia una distribución homogénea del consumo de verduras entre los cuatro posibles patrones, aunque el consumo diario o casi diario (4 en la escala) es el que sigue un menor número de pacientes.

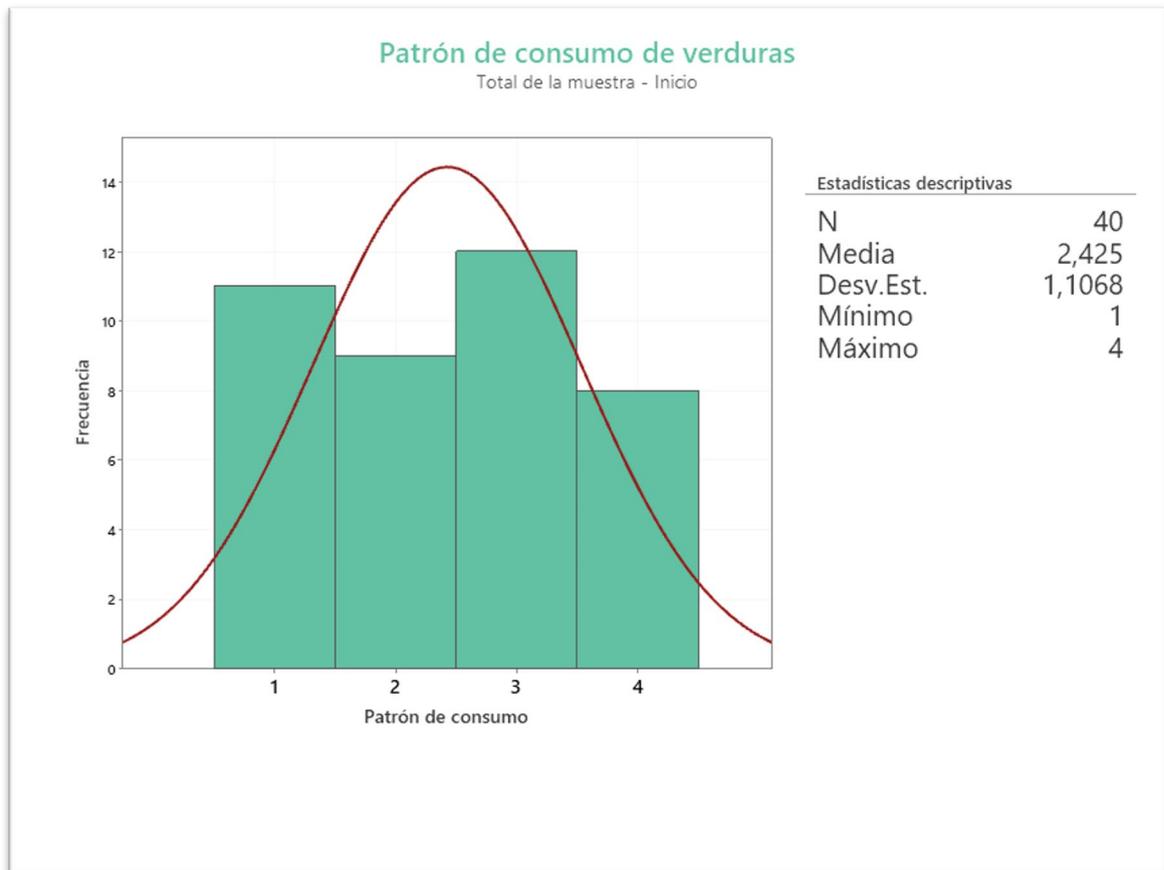


Figura 16: Histograma de frecuencia de consumo de verdura. Los patrones de consumo de diferentes grupos de alimentos se han cuantificado creando una escala que, del 1 al 4, califica el perfil de consumo de cada paciente para cada uno de esos grupos. El criterio de clasificación es el siguiente:

- 1: *No consumido o de manera muy esporádica*
- 2: *1 o 2 raciones a la semana*
- 3: *Entre 3 y 5 raciones a la semana*
- 4: *Más de 5 raciones a la semana*

En el grupo de mujeres destaca la ingesta de entre 3 y 5 raciones semanales de verdura. Sin embargo, en el grupo de hombres se observó una frecuencia inversamente proporcional a las raciones semanales consumidas.

4.1.7. Consumo de alimentos proteicos

En el caso de estos alimentos (Figura 17), se aprecia el consumo diario o casi diario de al menos una ración (siendo una ración equivalente a 100-150 g de carne o pescado incluyendo conservas de pescado y derivados cárnicos o 2 huevos).

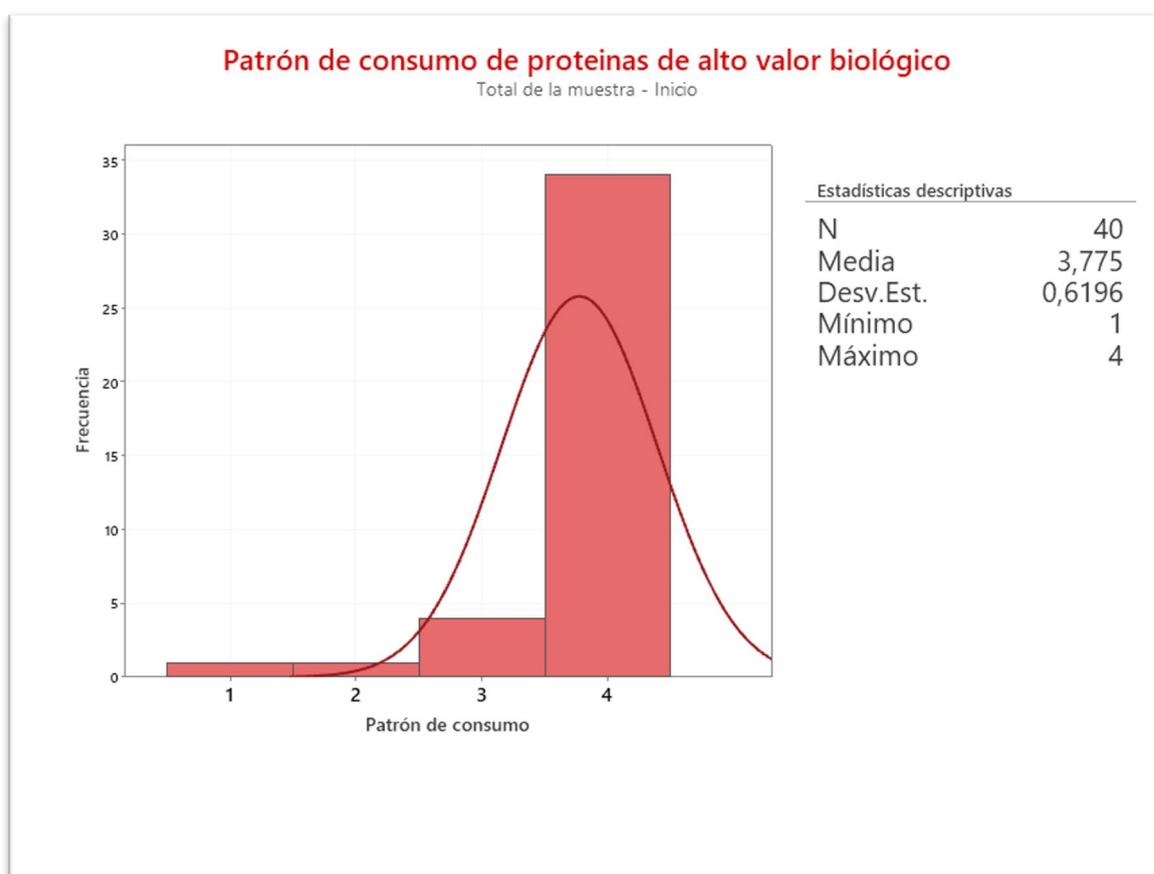


Figura 17: Histograma de frecuencia de consumo de alimentos proteicos. Utilizando la misma escala de frecuencia de consumo de alimentos, se clasificó a los pacientes en función de su consumo semanal de alimentos ricos en proteínas de alto valor biológico tales como carne, pescado y huevos.

4.1.8. Consumo de alimentos no recomendables

En la mayoría de los pacientes analizados se observa un elevado consumo de alimentos no recomendables (Figura 18), ya que la mayoría de la muestra de pacientes informa de un consumo diario o casi diario de al menos uno de estos productos previamente a este ensayo nutricional.

En el grupo de mujeres, al igual que en el total de la muestra, el patrón de consumo mayoritario es el diario.

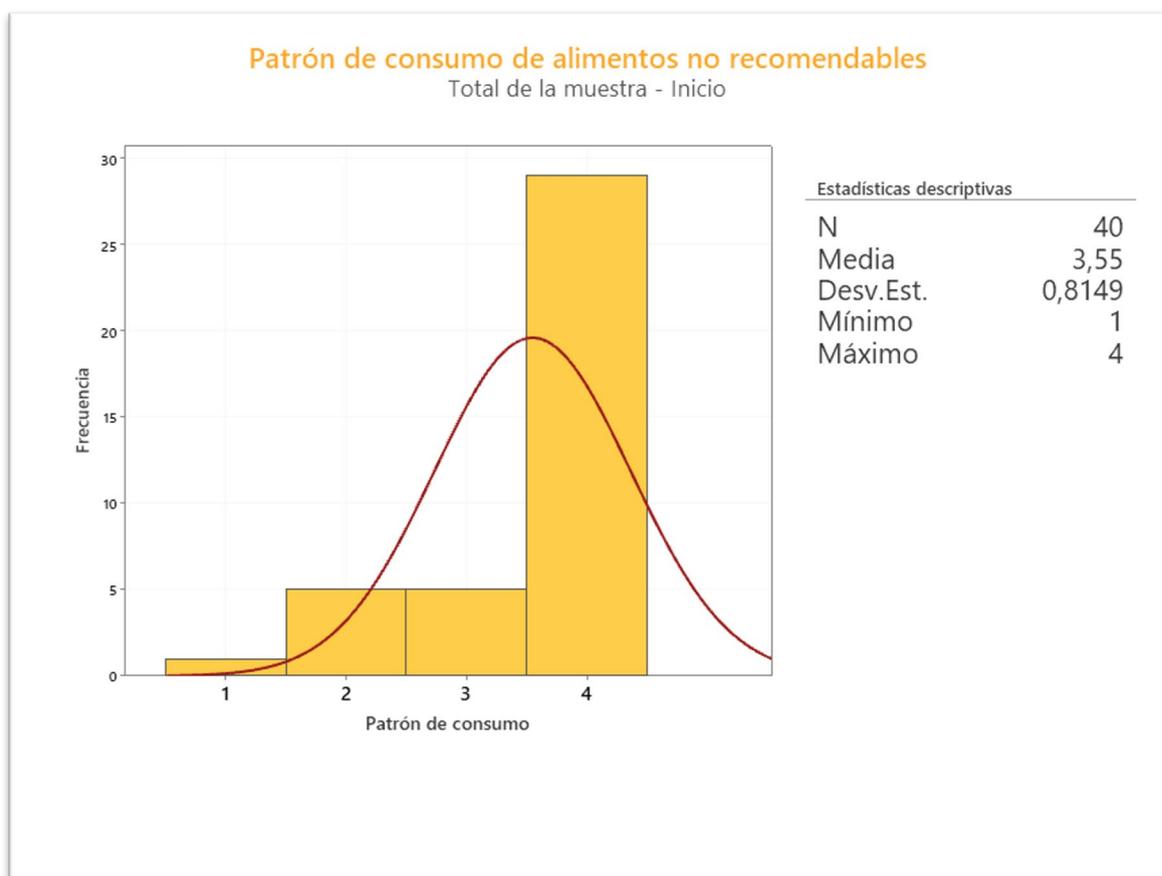


Figura 18: Histograma de frecuencia de consumo de alimentos no recomendables. Se clasificó a los pacientes, utilizando la misma escala, de frecuencia de ingesta de alimentos, en este caso denominados “no recomendables”. Este grupo de alimentos lo integran alimentos ricos en azúcar y grasas saturadas como bollería industrial incluidas galletas y la mayor parte de cereales de desayuno, snacks, dulces, refrescos azucarados, bebidas alcohólicas, embutidos grasos y algunos productos procesados y precocinados, así como “comida rápida” no casera.

En el grupo de hombres esa tendencia se acentúa ya que la práctica totalidad de los hombres de la muestra informan de un consumo diario de al menos unos de estos productos.

4.1.9. Parámetros bioquímicos basales de la muestra de pacientes

HOMOCISTEÍNA

La homocisteína, compuesto resultante del metabolismo de la metionina, se elimina por su conversión a cisteína o por remetilación a metionina. Estas reacciones requieren la participación de vitamina B₆, vitamina B₁₂ y folato como cofactores, por lo que una deficiencia en alguna de estas vitaminas puede suponer un incremento en los niveles de homocisteína. En los últimos años se ha observado que los niveles de homocisteína podrían ser mayores en población con EM (Triantafyllou et al., 2008; Rangel Oliveira et al., 2017; Kararizou et al., 2013; Dardiotis et al., 2017). Por ello, en este trabajo decidimos analizar los niveles de homocisteína en nuestra muestra.

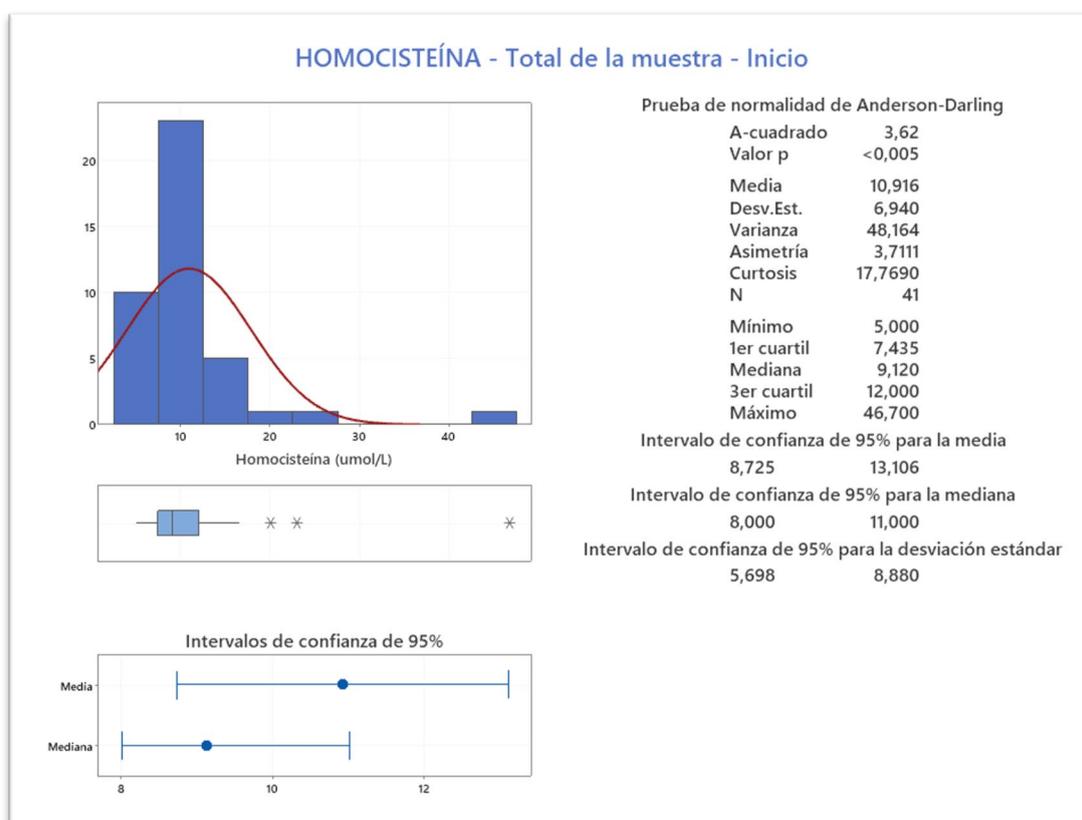


Figura 19: Resumen estadístico de los valores de homocisteína basal de la muestra de pacientes.

El total de pacientes de la muestra presenta un nivel de homocisteína de 10,9 $\mu\text{mol/L}$, con valores entre 5 hasta 46,7 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 19). El grupo de mujeres presenta una homocisteína media ligeramente inferior al total, de 9,2 $\mu\text{mol/L}$, con un rango de valores entre 5 hasta 16,5. Por el contrario, los hombres presentan valores de homocisteína mayores, con una media de 16,1 $\mu\text{mol/L}$ y un rango entre 7,87 hasta 46,7. El actual rango de referencia es 0-15 $\mu\text{mol/L}$.

COLESTEROL

El colesterol es un lípido que tiene un importante papel en la fisiología neuronal. La mayor parte del colesterol en el cerebro adulto se encuentra en las vainas de mielina.

Se ha demostrado una asociación entre niveles elevados de colesterol y mayores grados de discapacidad en EM, lo que ha llevado a realizar varios estudios para elucidar el posible mecanismo por el que el colesterol podría atravesar la barrera hematoencefálica considerando la hipótesis de que la EM podría mostrar una de las señas de identidad de las enfermedades inflamatorias autoinmunes como es la ruptura de dicha barrera (Durfinová et al., 2018).

En nuestro trabajo hemos observado que el colesterol total basal medio de la muestra es de 189 mg/dL, con mínimo de 123 mg/dL y máximo de 255 mg/dL (Figura 20). Algo más del 25% de los pacientes presenta un colesterol mayor de 200 mg/dL. Las mujeres presentan un colesterol medio de 191 mg/dL, con un mínimo de 123 mg/dL y máximo de 244 mg/dL. También en el caso de las mujeres, más del 25% presenta valores mayores de 200. Los hombres presentan valores de colesterol ligeramente menores a las mujeres, con una media de 184 mg/dL, mínimo de 156 mg/dL y máximo de 255 mg/dL. Sólo dos pacientes presentan un colesterol superior a 200. El actual rango de referencia es 140-200 mg/dL.

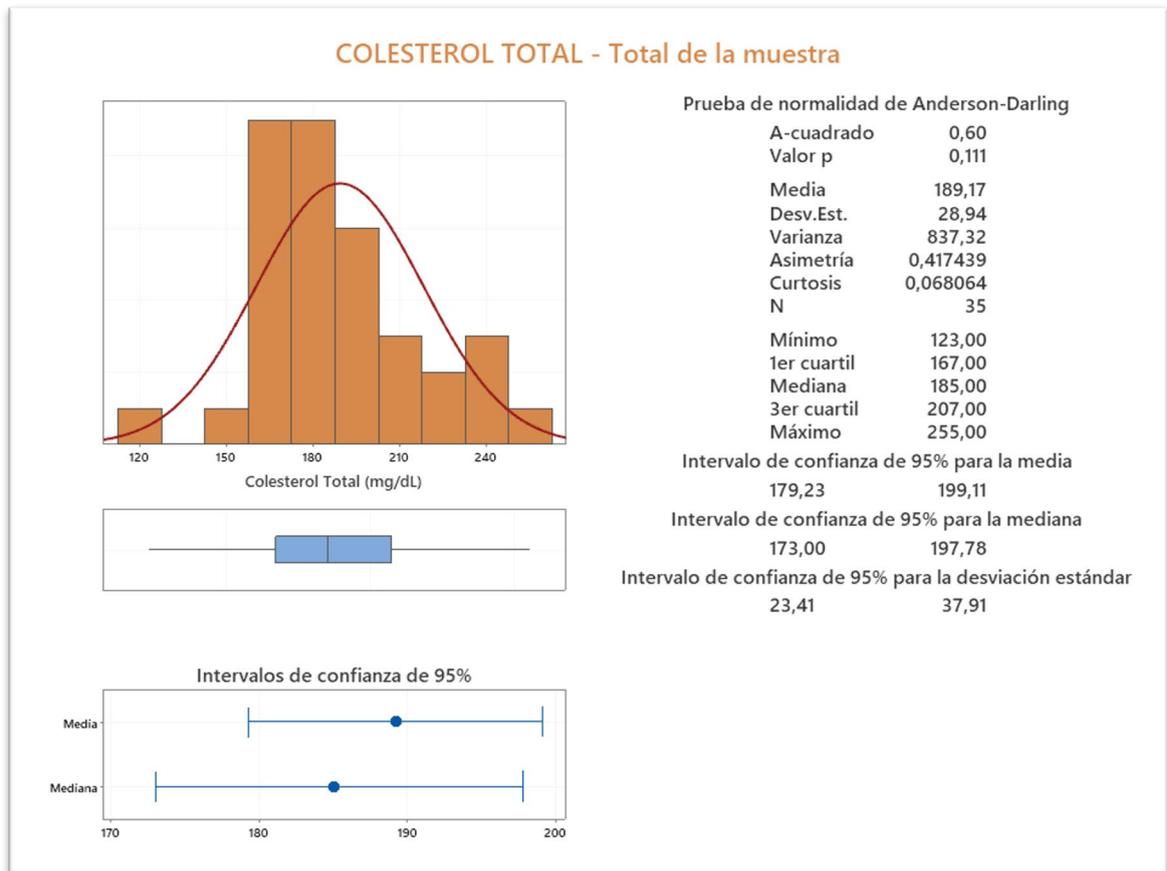


Figura 20: Resumen estadístico de los valores de colesterol total basal de la muestra de pacientes.

ÁCIDO FÓLICO

Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado una hiperhomocisteinemia en pacientes con EM, pero no parece estar relacionada con una deficiencia de folato (Li et al., 2020). Ya hemos visto en el capítulo 1 que si el balance de metionina es negativo y las concentraciones de SAM son bajas, la homocisteína es principalmente dirigida hacia la ruta de remetilación para formar metionina por la reacción mediada por EM. La vitamina B₁₂ es un cofactor y el metiltetrahydrofolato (metil-THF) un sustrato de esta reacción. El metil-THF se forma en una reacción catalizada por metilen-tetrahydrofolato reductasa (MTHFR), en la cual el 5,10-metilen tetrahydrofolato se reduce a 5-metiltetrahydrofolato (metil-THF). La reacción mediada por MTHFR es un paso limitante en la formación de metil-THF en el metabolismo del folato. Esta reacción es

especialmente importante en la formación de metionina a partir de homocisteína, ya que el metil-THF actúa como sustrato para EM.

Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, el mecanismo de eliminación de la homocisteína implica dos vías: (1) por conversión a cisteína, lo que implica la presencia de vitamina B6 como cofactor; (2) por remetilación a metionina, para lo cual es necesario disponer de vitamina B12 y ácido fólico. Por lo tanto, una deficiencia de alguna de estas vitaminas podría provocar un aumento de los niveles de homocisteína. Sin embargo, en los pacientes con EM, todo parece indicar que el mecanismo que produce mayores niveles de homocisteína es independiente de una posible carencia de estas vitaminas, ya que no se observan deficiencias.

Las analíticas indican que el ácido fólico plasmático medio en la muestra de pacientes es de 7,6 ng/mL, con mínimo de 2,6 ng/mL y máximo de 13,2 ng/mL. El rango de referencia del ácido fólico es 3 – 17 ng/mL (Figura 21).

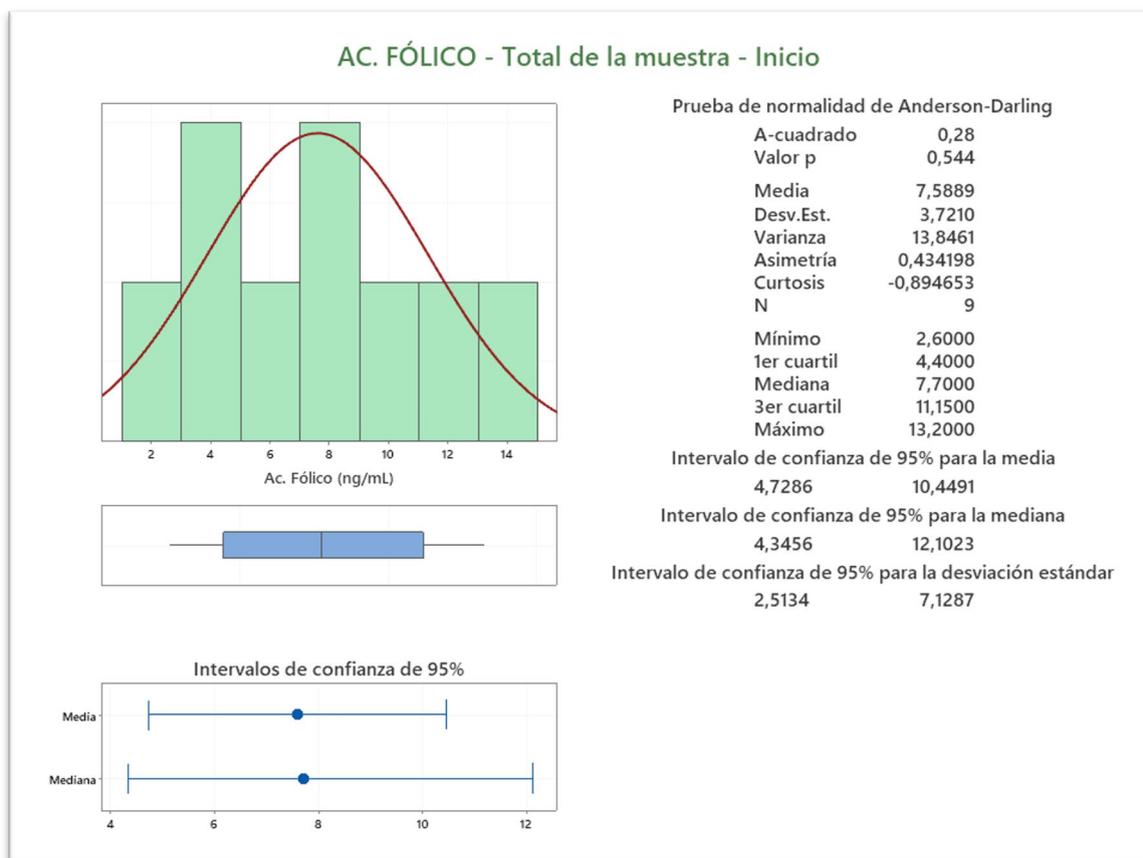


Figura 21: Resumen estadístico de los valores de ácido fólico basal de la muestra de pacientes.

VITAMINA D

La vitamina D, además de su papel en el metabolismo del calcio, juega también un papel importante en la homeostasis del sistema inmune. Así, se postula la vitamina D como biomarcador en pacientes con EM remitente-recurrente y su suplementación puede ser potencialmente eficaz como parte del tratamiento.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que hay una distribución geográfica característica de la EM, con una prevalencia mínima en las regiones ecuatoriales y aumentando según nos movemos hacia latitudes más al norte o más al sur.

Esta distribución podría entenderse debido a las evidencias que relacionan una menor exposición a la luz solar y, por tanto, falta de vitamina D, como factor que predispone para padecer EM (Jagannath et al., 2018).

Sabemos que la vitamina D, además de su papel en el metabolismo del calcio, juega también un papel importante en la homeostasis del sistema inmune. Así, se postula la vitamina D como biomarcador en pacientes con EM remitente-recurrente y su suplementación puede ser potencialmente eficaz como parte del tratamiento. Aunque los estudios hechos hasta hoy muestran resultados poco concluyentes sobre el efecto de la suplementación con vitamina D, la evidencia actual sugiere que los pacientes con EM deben evitar la insuficiencia de vitamina D (Smolders et al., 2009).

Los resultados obtenidos en nuestro grupo de pacientes muestran que el valor medio es de 27,3 ng/mL, con mínimo de 12,7 ng/mL y máximo de 46,9 ng/mL. El rango de referencia es 20-55 ng/mL y, a la vista de la distribución, un 25% de la muestra presenta déficit de vitamina D (Figura 22).

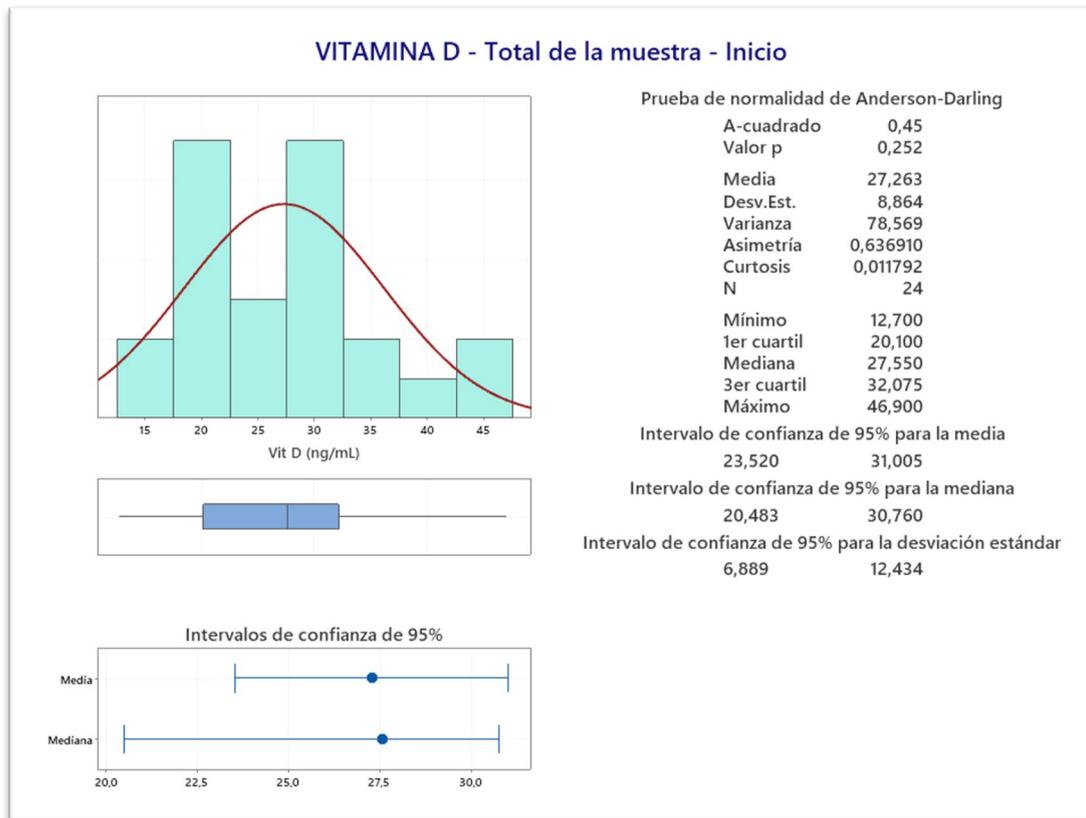


Figura 22: Resumen estadístico de los valores de vitamina D basal de la muestra de pacientes.

HIERRO

El hierro es fundamental en el mantenimiento de las funciones del sistema nervioso central. No sólo se requiere para la síntesis de mielina y la mielinización axonal sino que también juega un papel clave en las reacciones inflamatorias (Connor y Menzies, 1996). La mielinización y el mantenimiento de la mielina son procesos que requieren hierro en muchas reacciones enzimáticas y la funcionalidad de esas enzimas se ve reducida en caso de déficit de hierro. Los oligodendrocitos son especialmente sensibles a fluctuaciones de la concentración de hierro intracelular e indica que la deficiencia de hierro puede provocar oligodendrocitos defectuosos y promover la desmielinización mientras que un aumento anormal del hierro intracelular promueve estrés oxidativo (Schonberg y McTigue, 2009). Este estrés oxidativo se ha relacionado con la patogénesis de la EM (Adiete y Adiele, 2017). Estas evidencias hacen que, dado que el hierro es un parámetro modificable con la dieta, debemos monitorizar su evolución a lo largo del estudio.

Nuestra muestra presenta una concentración de hierro plasmático medio de 78,6µg/dl, con mínimo de 37 µg/dl y máximo de 124 µg/dl. El rango de referencia es 33 - 193 µg/dl. Es decir, partimos de una muestra cuyos datos de hierro se encuentran dentro del rango de referencia (Figura 23).

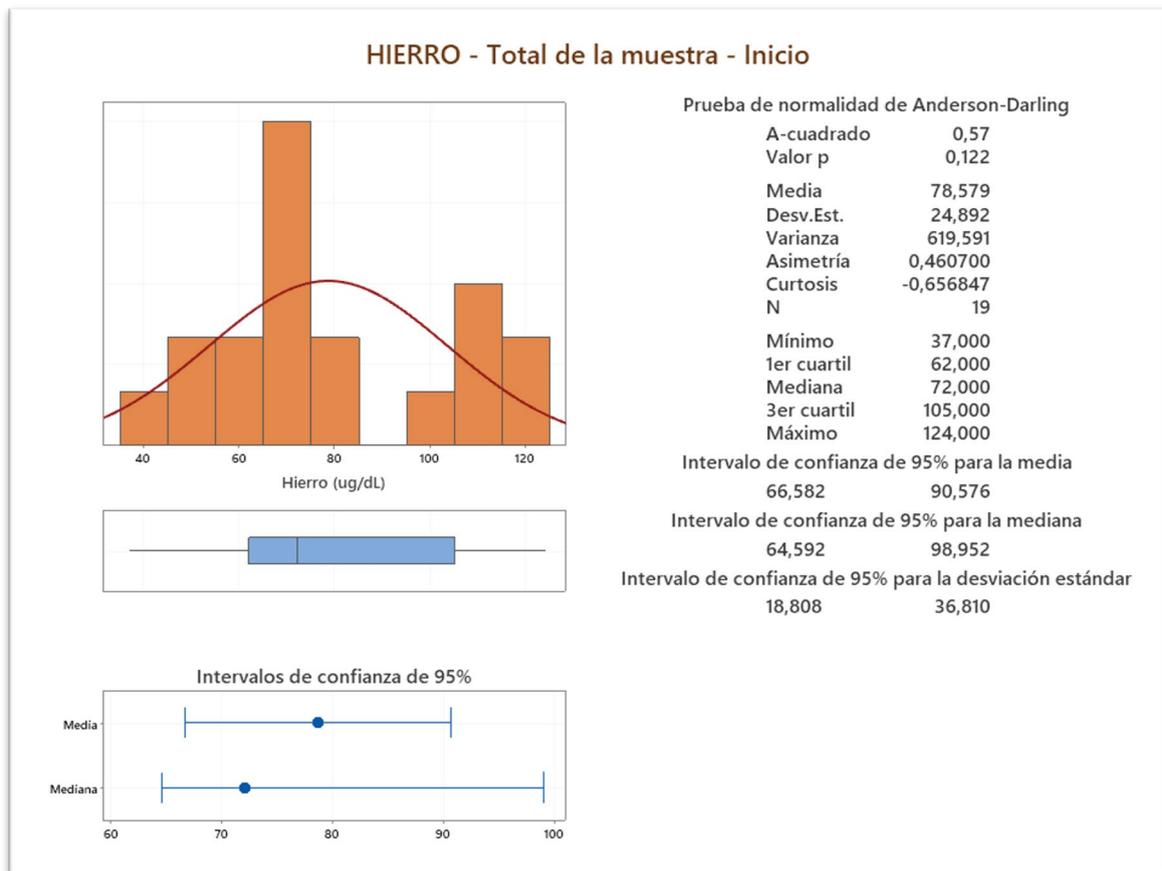


Figura 23: Resumen estadístico de los valores de hierro plasmático basal de los pacientes de la muestra.

GLUCOSA

No existen evidencias de que la EM pueda tener implicaciones en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, dado que el estudio es una intervención nutricional, se consideró oportuno su análisis y seguimiento.

La glucosa plasmática media de la muestra es 81,8, con mínimo de 64 y máximo de 101 mg/dl. El rango de referencia es 76 – 110 mg/dL. Cerca del 25% de la muestra presenta una glucosa basal en ayunas por debajo del rango de referencia (Figura 24).

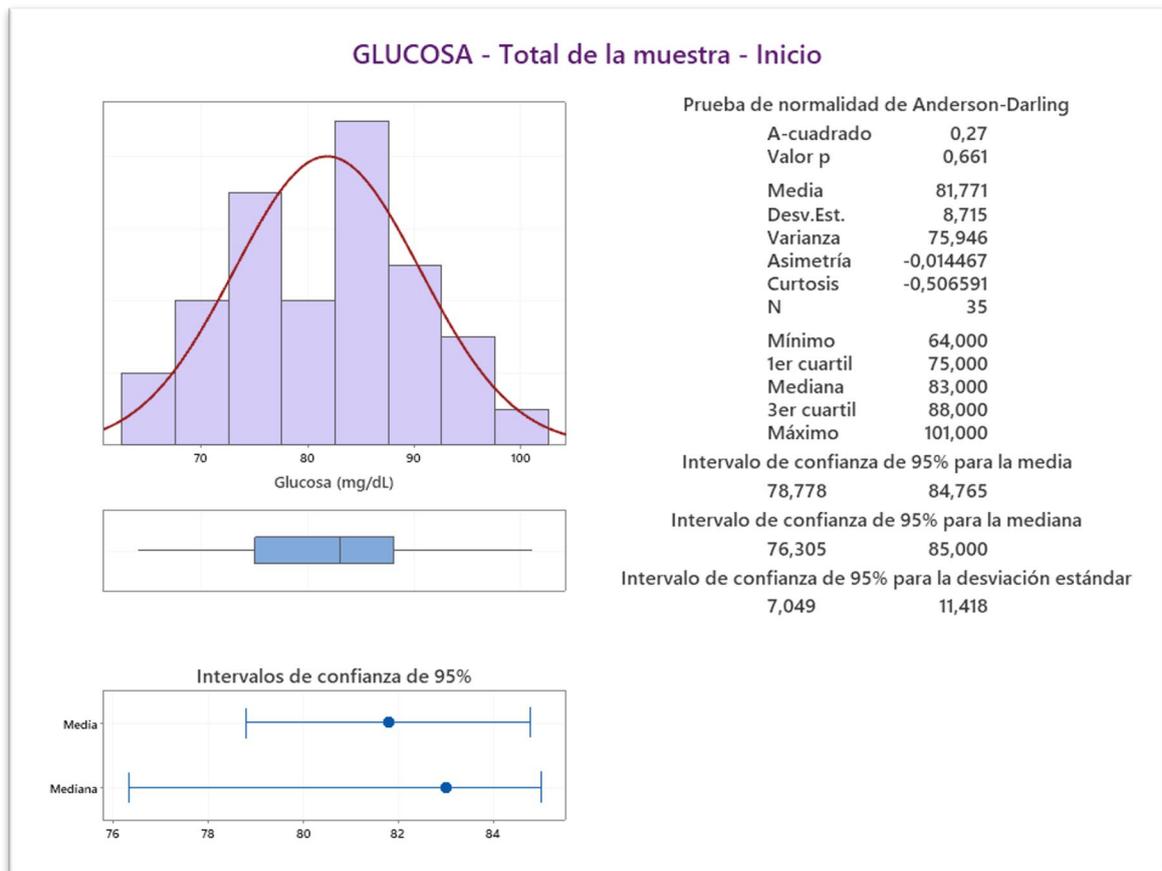


Figura 24: Resumen estadístico de los valores de glucosa basal de los pacientes de la muestra.

ALBÚMINA

Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de los pacientes del estudio están afectados por la variante EMRR, pero, es probable que, con el tiempo, desarrollen una forma progresiva de la enfermedad. Las lesiones activas desmielinizantes pueden provocar la migración de células inmunes proinflamatorias al sistema nervioso central, y este proceso está relacionado con la ruptura de la barrera hematoencefálica. Además, estas filtraciones a través de la barrera hematoencefálica pueden producir a su vez el trasvase de componentes plasmáticos al sistema nervioso central. La albúmina sérica representa aproximadamente el 50% de las proteínas plasmáticas y cumple una amplia variedad de funciones como, por ejemplo, el transporte de ácidos grasos y de algunas hormonas, influenciar la cinética de muchos fármacos, enlazarse a metales o actuar como antioxidante entre otras (Figura 26). Dada su alta concentración plasmática, la

albúmina accede al sistema nervioso central a través de las fisuras en la barrera hematoencefálica originadas en la EM. Una vez se encuentra en el sistema nervioso central, las evidencias sugieren que la albúmina no es un espectador inerte, sino que participa en la evolución de la enfermedad dada su abundancia relativa y sus propiedades moleculares, pudiendo ejercer acciones beneficiosas o perjudiciales. Entre las beneficiosas podemos incluir el ser objetivo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y reduciendo por tanto el daño de estas a otras moléculas. La albúmina también puede reducir la producción de ROS y RNS por su captación de hierro y hemo. Pero, por otro lado, tenemos los efectos perjudiciales como inducir la producción de citoquinas proinflamatorias o interferir en la homeostasis del potasio haciendo a las neuronas potencialmente más vulnerables a la excitotoxicidad por glutamato (LeVine, 2016).

La muestra de pacientes presenta unas proteínas totales medias basales de 7,07 g/dL, con un mínimo de 6,1 g/dL y un máximo de 8,2 g/dL (Figura 25). Dado que el rango de referencia es de 6,4 – 8,3 g/dL., la práctica totalidad de la muestra se encuentra dentro del rango, aunque la distribución es asimétrica y los pacientes presentan valores sobre todo en la mitad inferior del rango.

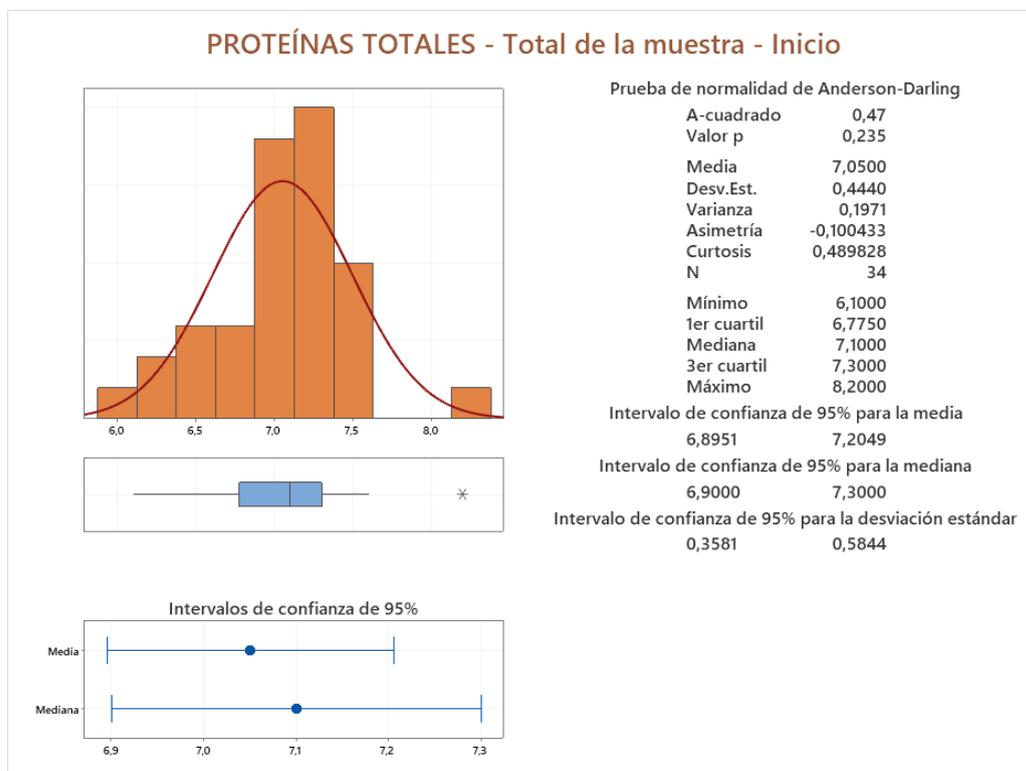


Figura 25: Resumen estadístico de los valores basales de proteínas totales de los pacientes de la muestra.

En cuanto a la albúmina, los pacientes de la muestra presentan un valor medio basal de 4,71 g/dL (Figura 26).

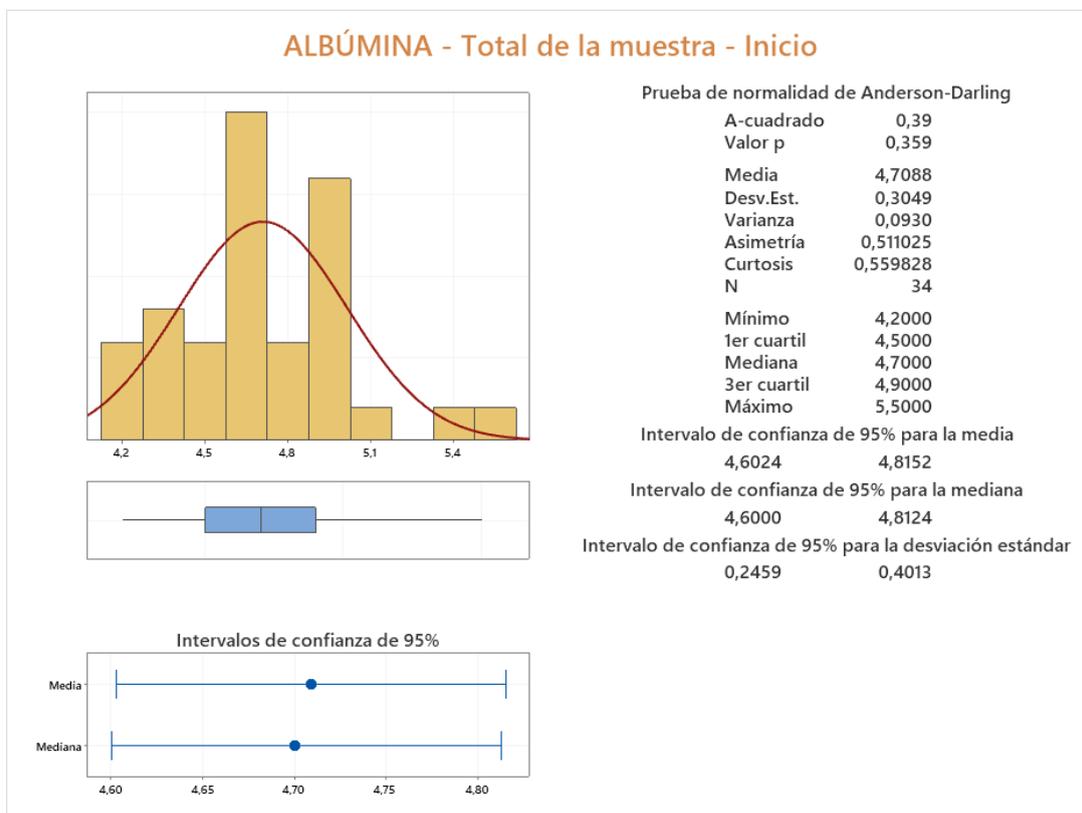


Figura 26: Resumen estadístico de los valores de albúmina basal de los pacientes de la muestra.

OTROS PARÁMETROS

Además de los parámetros indicados anteriormente, se obtuvieron otros que, en principio, podrían considerarse de menor relevancia para el estudio (Figura 27). Como veremos en el apartado correspondiente, estos parámetros también fueron objeto de seguimiento y análisis a lo largo del estudio.

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
HEMOGLOBINA (g/dL)			min	max	13-18
Total	81,8	8,7	78,8	84,8	
Mujeres	81,7	9,3	77,9	85,4	
Hombres	82,1	7,3	76,5	87,7	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
URATO (mg/dL)			min	max	3,4-7
Total	4,1	1,4	3,6	4,6	
Mujeres	3,9	1,2	3,4	4,3	
Hombres	4,9	2	3,4	6,5	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
CREATININA (mg/dL)			min	max	0,7-1,2
Total	1	1,4	0,5	1,5	
Mujeres	1,1	1,7	0,4	1,7	
Hombres	1	0,16	0,9	1,1	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
PROTEINAS TOTALES (g/dL)			min	max	6,4-8,3
Total	7,1	0,4	6,9	7,2	
Mujeres	7	0,5	6,8	7,2	
Hombres	7,2	0,4	6,9	7,5	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
FERRITINA (ng/mL)			min	max	30-400
Total	139,3	143,5	70,1	208,4	
Mujeres	65,8	44,7	37,5	94,2	
Hombres	265,1	169,8	108,1	422,2	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
CALCIO (mg/dL)			min	max	8,6-10
Total	9,5	0,3	9,4	9,6	
Mujeres	9,4	0,3	9,3	9,6	
Hombres	9,6	0,3	9,4	9,8	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
HDL COLESTEROL (mg/dL)			min	max	40-120
Total	62,2	17,2	53,6	70,7	
Mujeres	64,5	18,9	51,8	77,1	
Hombres	58,6	14,9	44,8	72,3	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
LDL COLESTEROL (mg/dL)			min	max	71-130
Total	114,8	24,6	102,6	127,1	
Mujeres	116,8	24	100,7	133	
Hombres	111,7	27,1	86,7	136,7	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)			min	max	47-150
Total	87,2	43,8	72,2	102,2	
Mujeres	91,7	47,4	72,6	110,9	
Hombres	74,1	29,5	51,4	96,8	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
ALBÚMINA (g/dL)			min	max	3,5-5,2
Total	4,7	0,3	4,6	4,8	
Mujeres	4,7	0,3	4,5	4,8	
Hombres	4,9	0,14	4,8	5	

	Media	Des std.	Intervalo conf.		Ref.
TRANSFERRINA (mg/dL)			min	max	200-360
Total	252,6	41,3	232,1	273,1	
Mujeres	263,8	45	233,6	294,1	
Hombres	235	29,3	207,9	262,1	

Figura 27: Valores basales de hemoglobina, urato, colesterol-HDL, colesterol-LDL, creatinina, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, ferritina, transferrina y calcio. Para cada parámetro se indica la media de toda la muestra de pacientes, en el subgrupo de hombres, en el subgrupo de mujeres, la desviación estándar y los valores mínimo y máximo de los intervalos de confianza (95%) correspondientes.

4.1.10. Datos de los controles

DISTRIBUCIÓN POR EDAD

Se reclutaron 22 controles, 18 mujeres y 4 hombres, siendo la distribución por edad y la proporción hombres/mujeres fue similar a la de la población de estudio. La media de edad de los controles fue de 39 años (Figura 28).

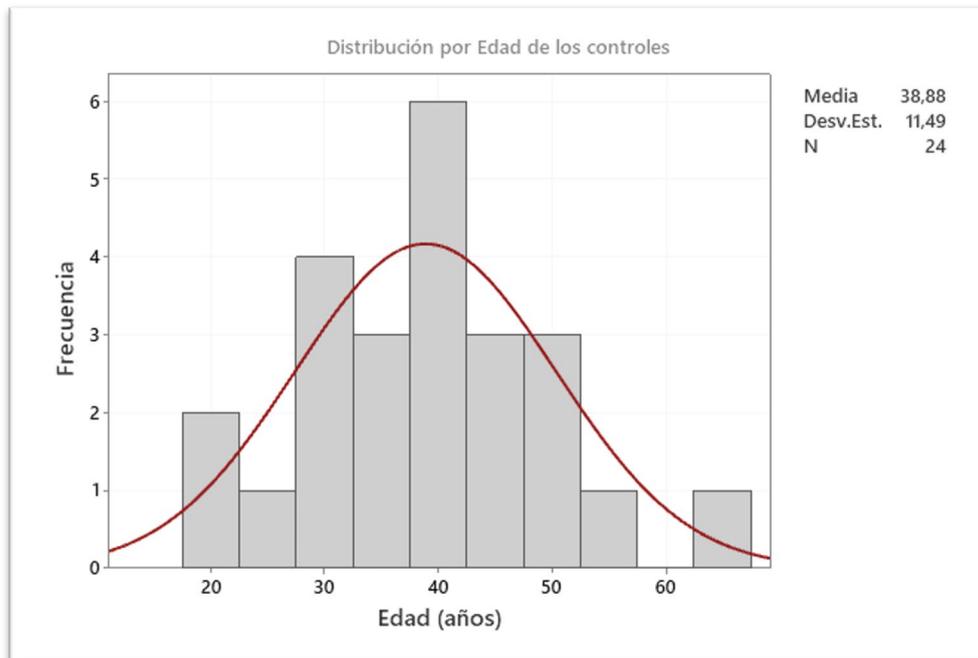


Figura 28: Histograma de edad de los controles. Se reclutaron 22 controles sin esclerosis múltiple entre personal sanitario y personas que acudían por otros motivos a la consulta de neurología.

HOMOCISTEÍNA

La población control presenta un valor de homocisteína medio de 7,4, con mínimo de 5 y máximo de 11,2 (Figura 29).

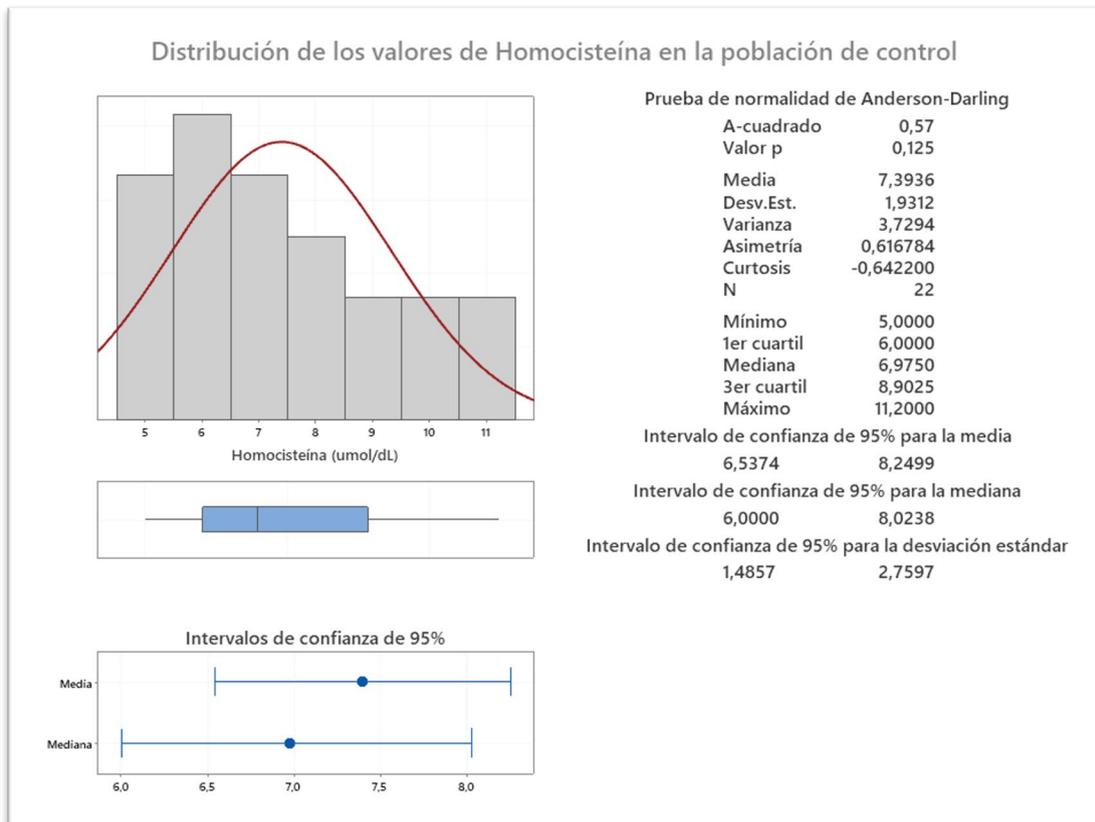
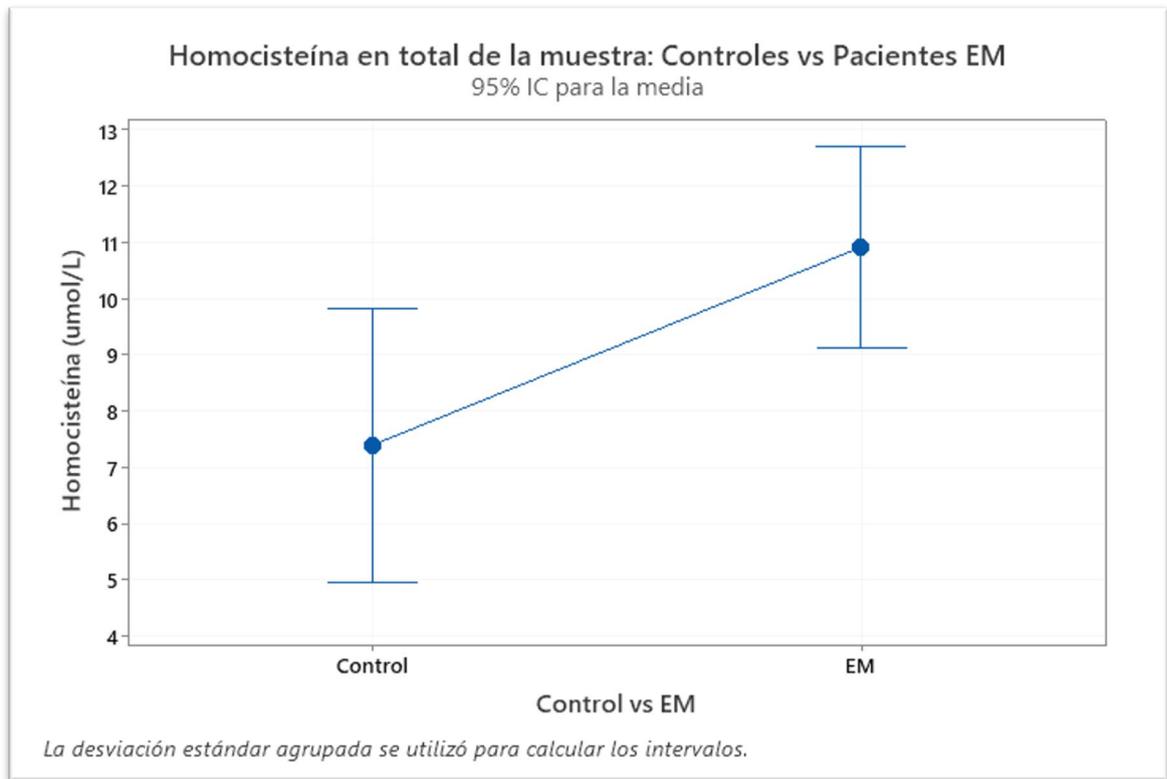


Figura 29: Resumen estadístico de los valores de homocisteína de los controles.

4.2. RESULTADOS DERIVADOS DE VALORES BASALES

4.2.1. Homocisteína de pacientes vs grupo de control

Dada la importancia que tiene la homocisteína en la EM nos propusimos comparar los valores de homocisteína de la muestra de estudio frente a los controles. Los primeros resultados confirman que los pacientes con EM presentan valores de homocisteína mayores que los controles sin enfermedad. El ANOVA indica una diferencia significativa respecto a este parámetro entre ambos grupos (Figura 30).



Análisis de Varianza

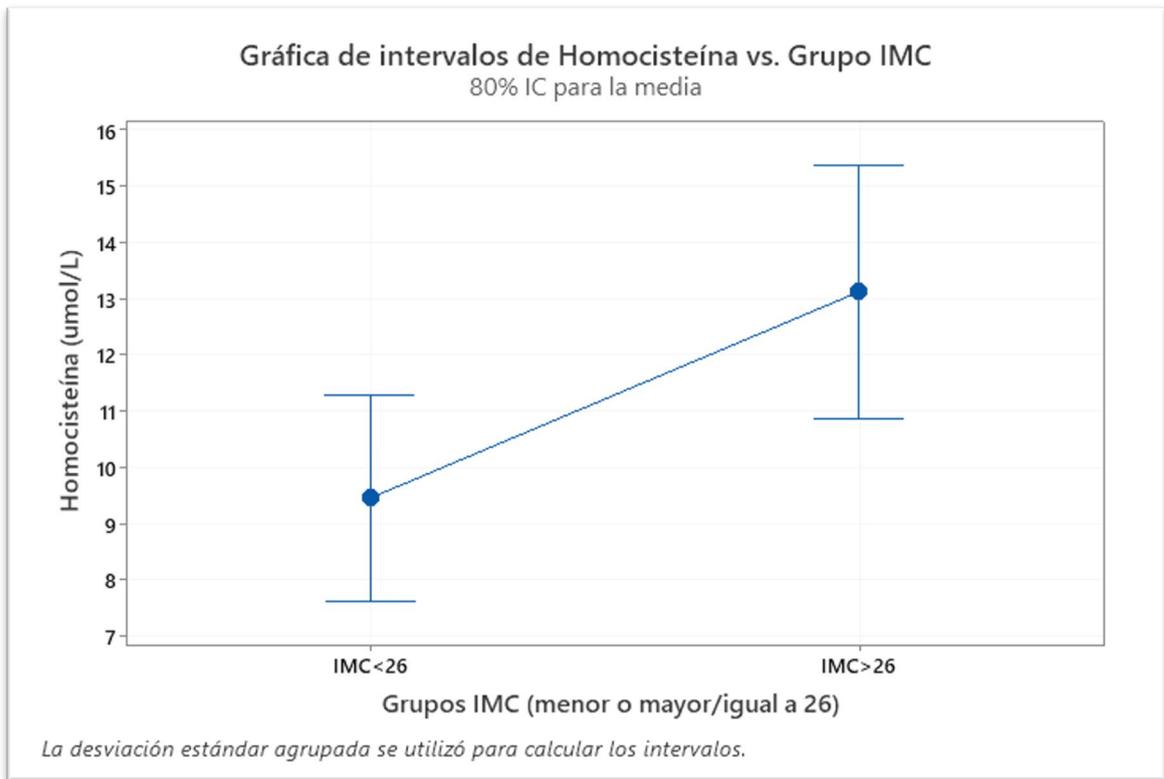
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Control vs EM	1	177,6	177,62	5,40	0,023
Error	61	2004,9	32,87		
Total	62	2182,5			

Figura 30: ANOVA y representación gráfica de intervalos de valores basales de homocisteína en la muestra de pacientes frente los valores de homocisteína en los controles.

4.2.2. Correlación entre homocisteína e IMC en pacientes

Con el fin de determinar si existía una relación entre el IMC y los niveles de homocisteína en los pacientes estudiados, se decidió analizar si existía una correlación entre ambos. Para ello, se dividieron los pacientes en función de su IMC, agrupando por una parte a aquellos con IMC menor o igual a 25,9 y, por otra, aquéllos con IMC igual o mayor de 26.

Se observó una diferencia significativa en niveles de homocisteína entre ambos grupos de pacientes para un $\alpha = 0,2$ (Figura 31).



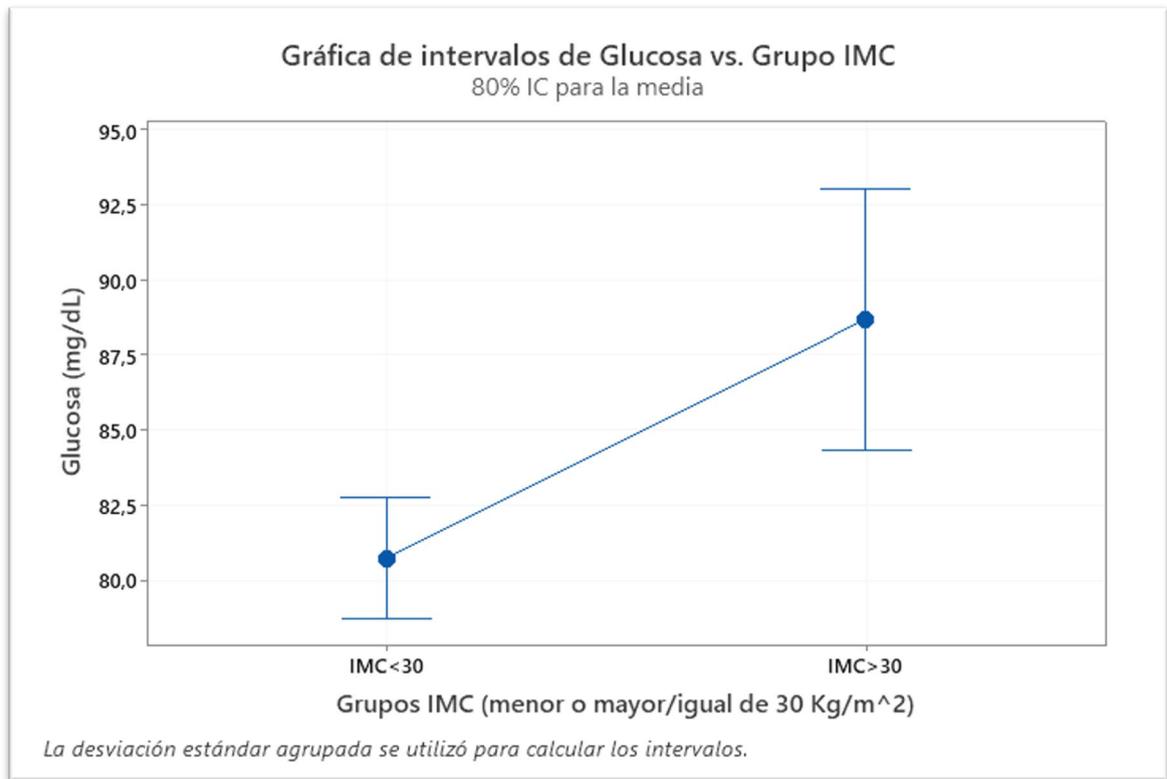
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo IMC A/B (25,9)	1	128,8	128,85	2,72	0,107
Error	38	1797,7	47,31		
Total	39	1926,5			

Figura 31: ANOVA y representación gráfica de valores de homocisteína en grupo de pacientes frente a su IMC agrupados en IMC < 26 Kg/m² e IMC :2 26 Kg/m².

4.2.3. Correlación entre glucosa e IMC en pacientes

Posteriormente, se realizó un análisis similar al de homocisteína, pero utilizando los datos que disponíamos de glucosa. En los análisis realizados comenzamos a ver un efecto utilizando corte a partir de IMC 26. Sin embargo, este efecto no es significativo hasta que no utilizamos como punto de corte el IMC 30, es decir, el que marca el inicio de la obesidad (Figura 32).



Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo IMC A/B (29,9)	1	312,5	312,48	4,70	0,038
Error	32	2127,0	66,47		
Total	33	2439,5			

Figura 32: ANOVA y representación gráfica de valores de glucosa en grupo de pacientes frente a su IMC agrupados en IMC < 30 Kg/m² e IMC :2 30 Kg/m².

Este mismo análisis se realizó para el colesterol total y para el colesterol LDL y no se observaron diferencias significativas.

4.2.4. Correlación entre ácido fólico e IMC en pacientes

Debido a que no disponíamos de los valores de ácido fólico basales de todos los pacientes, no se pudieron extraer conclusiones firmes. Sin embargo, con los datos disponibles, sí se aprecia una menor concentración de ácido fólico en las analíticas de pacientes con IMC:230 Kg/m² (Figura 33). La media de ácido fólico en pacientes con

obesidad es en torno a un 30% menor que en el grupo de pacientes en normopeso o con sobrepeso.

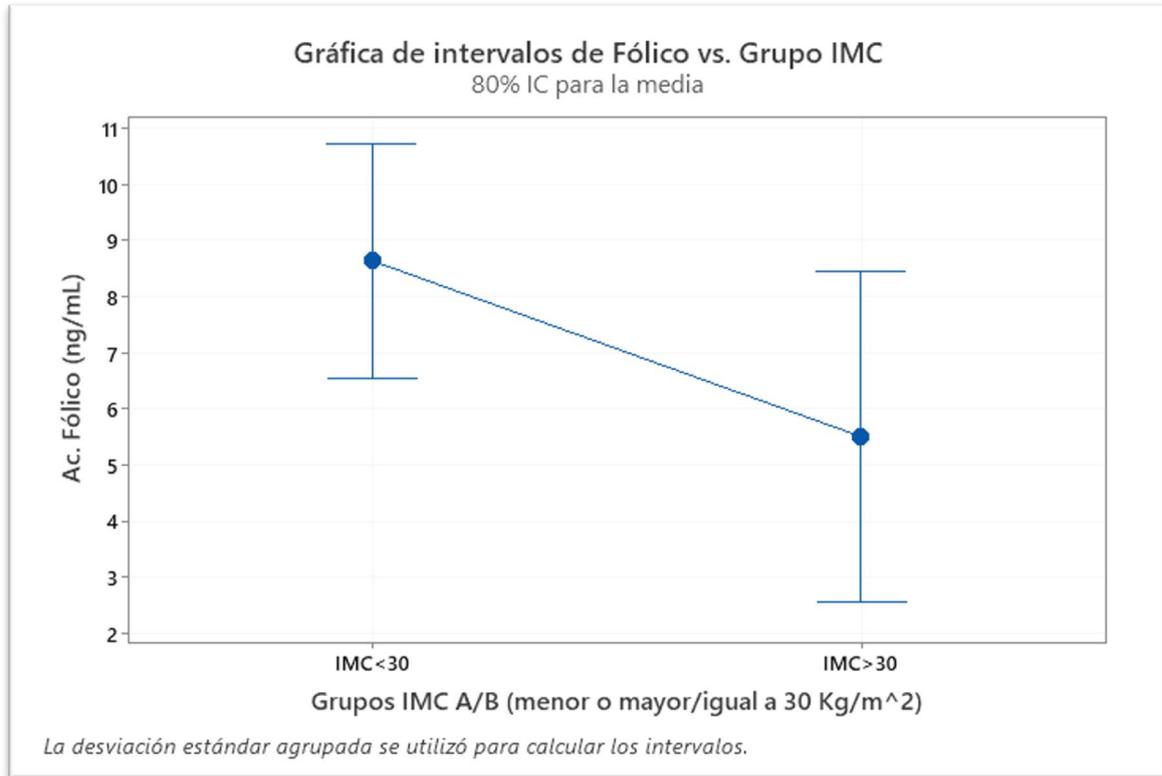


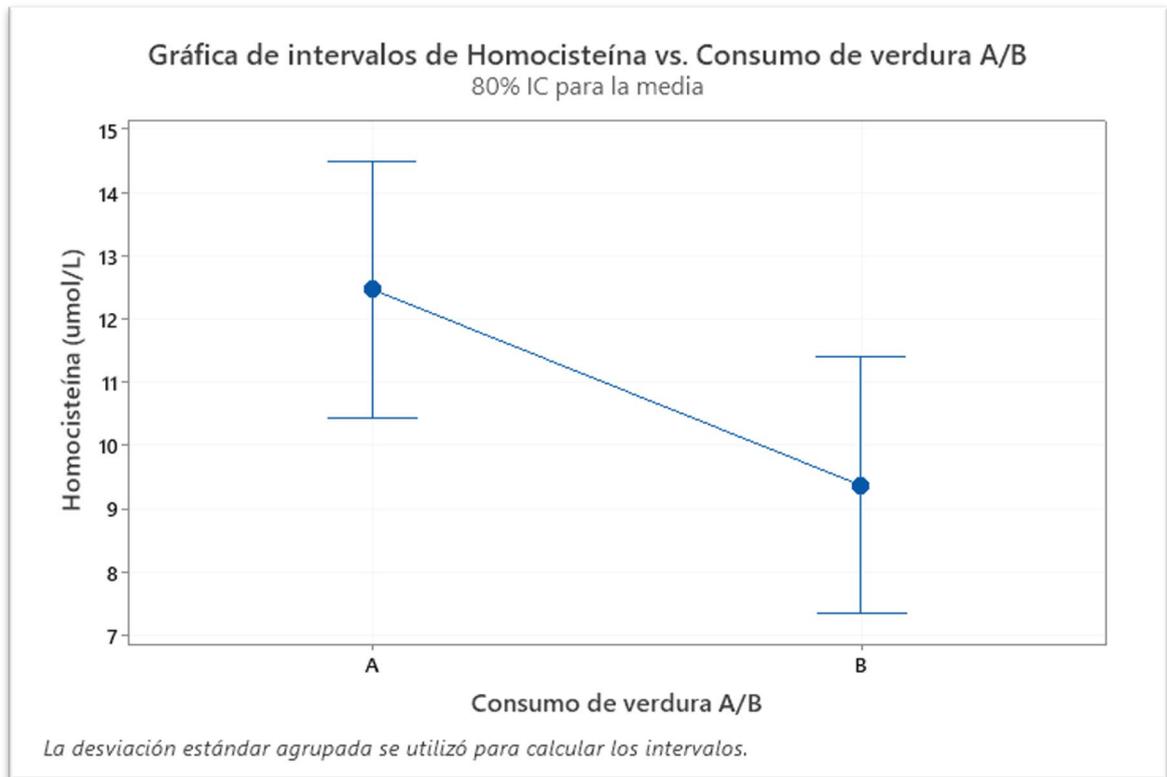
Figura 33: Representación gráfica de valores de ácido fólico en grupo de pacientes frente a su IMC agrupados en IMC < 30 Kg/m² e IMC :2 30 Kg/m².

4.2.5. Correlación entre homocisteína y consumo de verdura en pacientes

Para estudiar los posibles efectos que los hábitos alimentarios pudieran tener sobre los niveles de homocisteína de la muestra, clasificamos a los pacientes en dos grupos en función de la frecuencia con que consumen los grupos de alimentos estudiados.

Para esta clasificación hemos utilizado la escala de frecuencia antes descrita. Sin embargo, para simplificar el estudio, agrupamos los niveles 1 y 2 de la escala en un grupo A (consumo nulo o bajo del grupo de alimentos) y los niveles 3 y 4 en un grupo B (consumo frecuente o muy frecuente). Los datos así tratados muestran que sí puede observarse un efecto del mayor o menor consumo de dichos grupos de alimentos sobre los niveles de homocisteína. Sin embargo, con los datos de que disponemos, solo puede

hablarse de efecto significativo para el caso del consumo de verdura para un $\alpha = 0,2$ (Figura 34).



Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Consumo de verdura A/B	1	96,07	96,07	1,99	0,166
Error	38	1830,48	48,17		
Total	39	1926,54			

Figura 34: ANOVA y representación gráfica de intervalos de puntuación en escala simplificada de frecuencia de consumo de verdura frente a niveles de homocisteína. Los pacientes con puntuación 1 y 2 en la escala de frecuencia de consumo de alimentos (ver figura 16) se consideraron como de bajo consumo (subgrupo A) y los de puntuaciones 3 y 4 se consideraron como de alto consumo (subgrupo B). En eje Y se representa los valores de homocisteína basal medios e intervalos de confianza (80%) para cada subgrupo.

4.2.6. Correlación entre homocisteína y consumo de alimentos proteicos y alimentos no recomendables

En el caso de estos dos grupos de alimentos, en ambos se da la circunstancia de que sus frecuencias de consumo son muy altas en la mayoría de pacientes, por lo que los intervalos de homocisteína asociados son también muy amplios. No se pueden extraer conclusiones, aunque sí se aprecia una tendencia a niveles de homocisteína mayores en pacientes con mayor abuso de alimentos no recomendables (Figura 35).

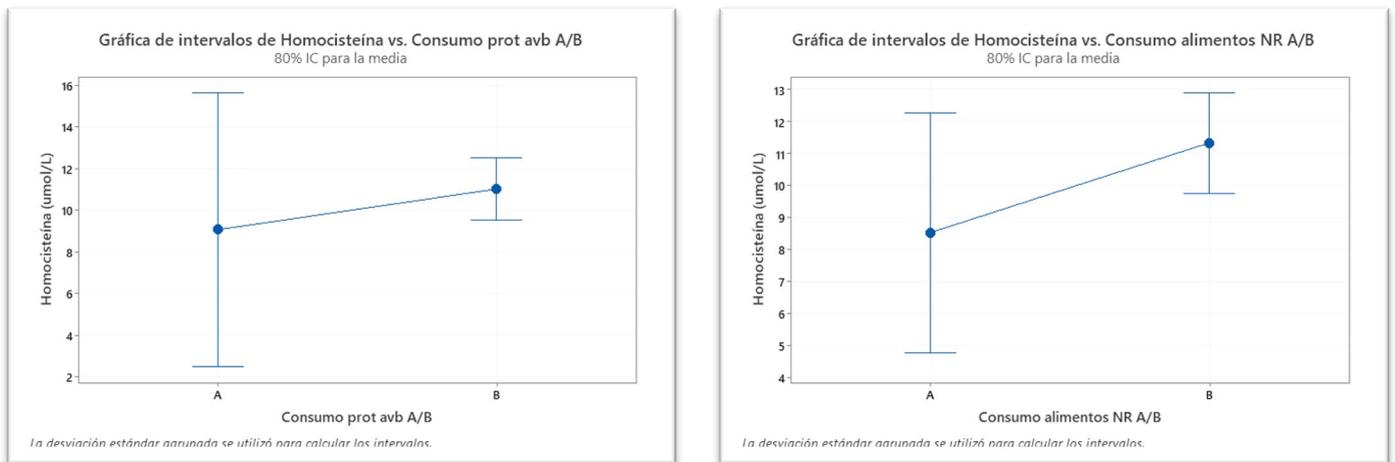


Figura 35: ANOVAs y representaciones gráficas de intervalos de puntuación en escala simplificada de frecuencia de consumo de alimentos proteicos y alimentos no recomendables frente a niveles de homocisteína. Los pacientes con puntuación 1 y 2 en la escala de frecuencia de consumo de alimentos (ver figuras 17 y 18) se consideraron como de bajo consumo (subgrupo A) y los de puntuaciones 3 y 4 se consideraron como de alto consumo (subgrupo B). En eje Y se representa los valores de homocisteína basal medios e intervalos de confianza (80%) para cada subgrupo.

4.2.7. Relación entre hábitos dietéticos y línea de tratamiento

Por último, se decidió estudiar la posible relación entre línea de tratamiento prescrita para cada paciente y los hábitos dietéticos de éstos. Para la evaluación de los hábitos dietéticos se utilizó la escala de frecuencia de consumo ya mencionada y que califica, del 1 al 4 (donde el 1 corresponde al consumo bajo o nulo y 4 al consumo diario), la frecuencia de consumo de tres grupos de alimentos (verduras, alimentos proteicos no procesados y fuente de proteínas de alto valor biológico y alimentos no recomendables como procesados, bollería o dulces entre otros). Para realizar las comparativas se han utilizado intervalos de confianza para el 80% de la muestra. Dado que se trata de una

evaluación cualitativa más que cuantitativa y para señalar las diferencias encontradas en la muestra de pacientes, que consideramos deben ser evidenciadas, se optó por reducir la potencia estadística de estos test para así resaltar las posibles diferencias entre pacientes de una u otra línea de tratamiento.

Los datos obtenidos (Figura 37) indican que los hábitos nutricionales de los pacientes y sus líneas de tratamiento están claramente relacionados. Podemos observar diferencias con relación al consumo de verduras y al consumo de alimentos proteicos.

Existe una clara diferencia respecto al consumo de verdura en función de la línea de tratamiento del paciente, siendo mayor el consumo de verdura entre los pacientes con tratamiento de primera línea comparado con los pacientes con tratamiento de segunda línea. Así mismo, se observó que la ingesta de alimentos proteicos era mayor en pacientes con tratamiento de primera línea que en pacientes con tratamiento de segunda línea.

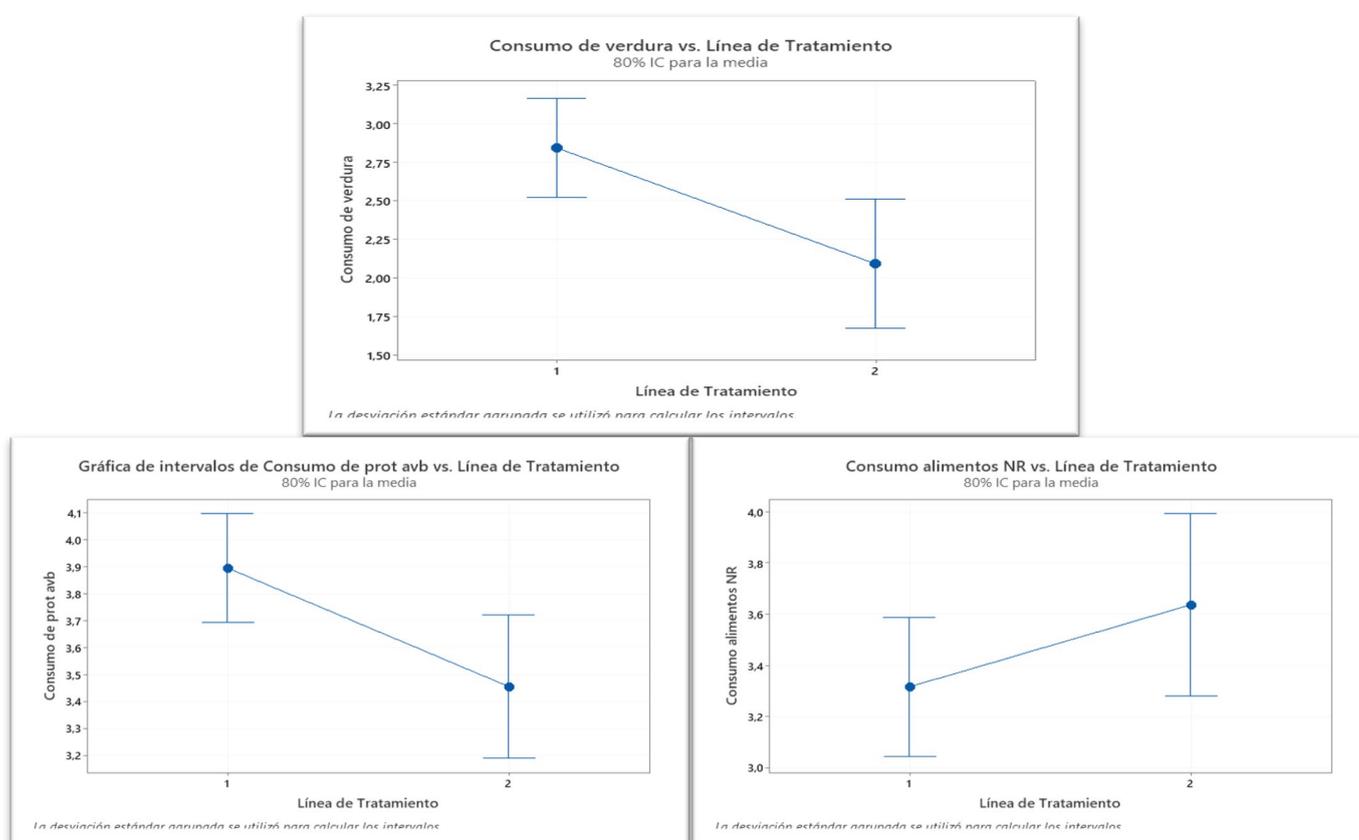


Figura 37: Representaciones de valoración en la escala de frecuencia de consumo de alimentos, siendo 1 la puntuación menor correspondiente a consumo bajo o nulo, y 4 la puntuación mayor correspondiente a consumo diario o casi diario.

Por último, se observa una media ligeramente superior en la valoración de ingesta de alimentos no recomendables en los pacientes con tratamiento de segunda línea, pero nada indica que esta diferencia pueda ser significativa.

4.2.8. Niveles de diferentes parámetros bioquímicos en función de la línea de tratamiento

Con el objetivo de buscar posibles efectos del tratamiento sobre los niveles bioquímicos, se agruparon los datos analíticos de los pacientes en función de su línea de tratamiento (Figura 36).

Aunque con los datos de que disponemos no puede hablarse de diferencias estadísticamente significativas, sí se aprecian ciertas tendencias que podrían ser objeto de posteriores estudios. Así, como puede verse en la figura 36, el nivel de homocisteína medio es menor en los pacientes que seguían tratamiento de segunda línea. Por otro lado, se observa que el grupo de pacientes con menores niveles de homocisteína seguían esta línea de tratamiento.

En el caso de la creatinina, también se observa una diferencia notable en los niveles en función de la línea de tratamiento del paciente. Los datos indican que el nivel de creatinina medio es prácticamente en doble (1,45 mg/dL) en los pacientes con tratamiento de segunda línea que en los pacientes con tratamiento de primera línea (media de 0,79 mg/dL). Además, del total de pacientes, el grupo de aquellos con menores niveles de creatinina, entre 0,15 y 0,6 mg/dL, seguían todos tratamiento de primera línea y, por el contrario, el grupo de pacientes con mayores niveles de creatinina, entre 1,45 y 2,3 mg/dL, seguían todos tratamiento de segunda línea.

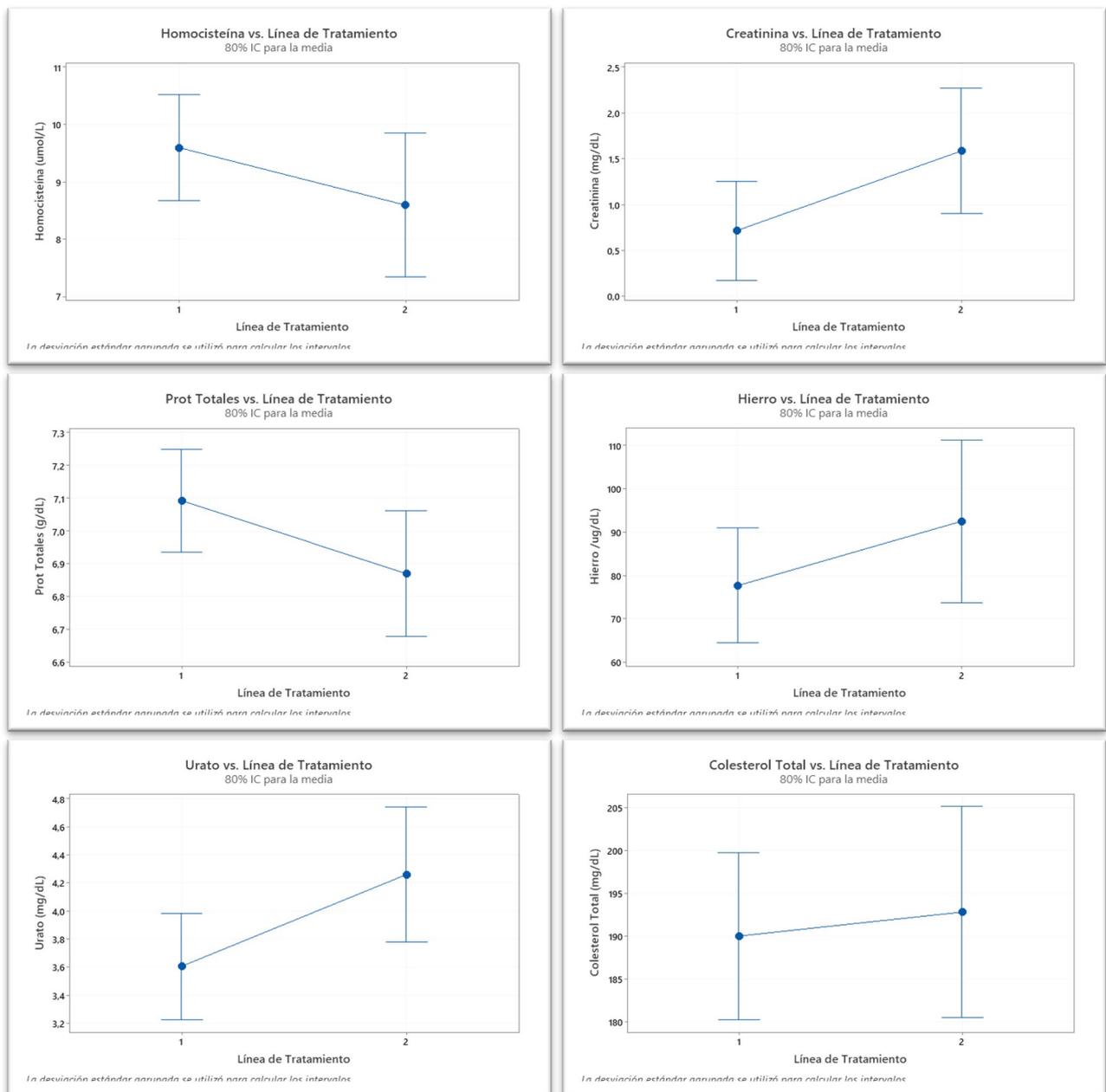


Figura 36: Representación gráfica de diferentes parámetros bioquímicos en la muestra de pacientes en función de la línea de tratamiento y con intervalos de confianza 80%.

Por otro lado, también se observa un efecto de la línea de tratamiento sobre los niveles de proteínas totales. Los pacientes con tratamiento de primera línea presentan niveles de proteínas totales, con una media de 7,15 g/dL, superiores a los de segunda línea, éstos con una media de 6,89 g/dL. Sin embargo, si discernimos estas proteínas totales y

nos fijamos en los valores de albúmina, los datos obtenidos no evidencian una diferencia significativa en los niveles de albúmina entre las líneas de tratamiento.

En el caso de urato, también se aprecian niveles diferentes en función de la línea de tratamiento seguida. Así, los pacientes con tratamiento de primera línea presentan un nivel medio de 3,6 mg/dL, inferior a los 4,2 g/dL que presentan los pacientes con tratamiento de segunda línea. Tomados en conjunto estos datos, nos encontramos que los pacientes con tratamiento de segunda línea presentan menores niveles de homocisteína y proteínas totales y mayores niveles de creatinina y urato respecto a los pacientes con tratamiento de primera línea. Esto podría indicar diferencias en el metabolismo proteico en función de la línea de tratamiento, pero éste, a su vez, podría ser considerado causa o efecto de la línea de tratamiento pautada.

En cuanto a los niveles de colesterol y hierro, los datos de que disponemos no indican diferencias significativas en función de la línea de tratamiento.

4.3. RESULTADOS LONGITUDINALES

Se hizo un seguimiento de un año a cada paciente, a lo largo del cual se evaluaba la adherencia a la dieta, se modificó o ajustó el plan nutricional para facilitar el seguimiento en función de las circunstancias del paciente, y se monitorizó la variación de peso. Además, se realizaron analíticas bioquímicas a los 6 meses y al año de seguimiento. Los resultados obtenidos durante el tiempo de seguimiento fueron los siguientes:

4.3.1. Variación total del IMC a lo largo del estudio

Los datos obtenidos después de un año de tratamiento nutricional indican que se ha producido una reducción del IMC medio de los pacientes a lo largo del estudio, pasando de un IMC basal medio de 25,63 Kg/m² a un IMC medio de 24,4 Kg/m² después de los 12 meses de tratamiento.

En la figura 38 se aprecia que, al tratarse de una muestra muy heterogénea en cuanto a IMC, con un grupo de pacientes con sobrepeso u obesidad y, por el contrario, un grupo

de pacientes con bajo peso ($IMC < 20 \text{ Kg/m}^2$) en los que incluso se incentivó la ganancia de peso, la variación total no resulta significativa.

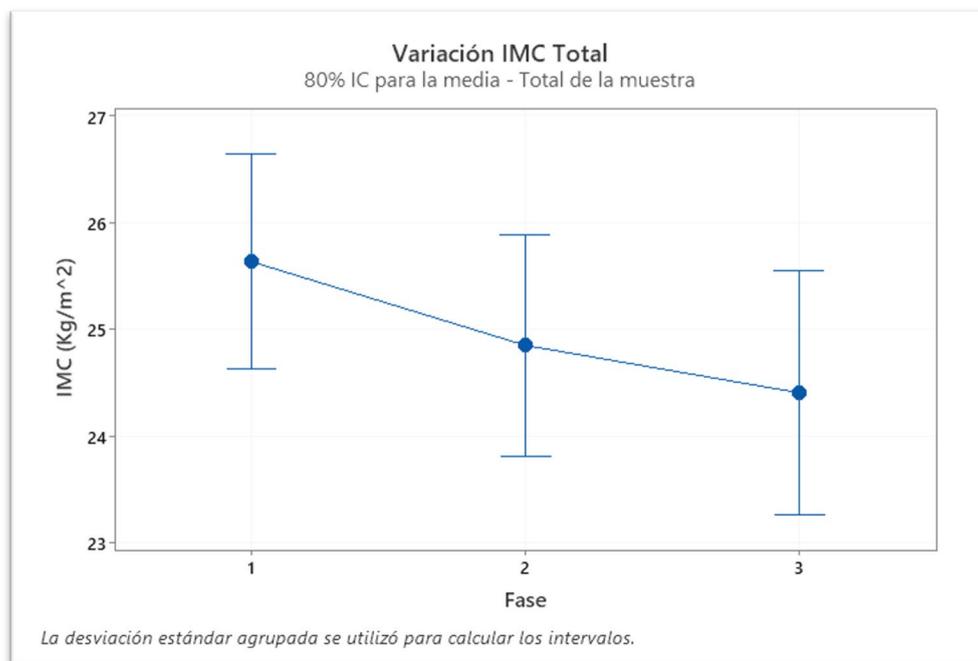


Figura 38: ANOVA y representación gráfica de valores de IMC en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican a qué medición hace referencia, siendo la fase 1 la medición antes de comenzar el tratamiento nutricional, fase 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y fase 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.2. Variación de la homocisteína según el seguimiento de la dieta

Los datos muestran una reducción de los niveles de homocisteína a los 6 meses de tratamiento nutricional (Figura 39).

En ese tiempo, el nivel medio de $10,92 \mu\text{mol/L}$ se reduce a $8,2 \mu\text{mol/L}$, es decir, una reducción de $2,7 \mu\text{mol/L}$, lo que supone casi un 25% respecto al nivel basal. Sin embargo, con los datos obtenidos en la fase 3 del estudio, no se produce una mayor reducción, manteniéndose los niveles de homocisteína estables desde segunda fase.

Con el fin de determinar si el seguimiento de la dieta de cada paciente influía en la reducción del nivel de homocisteína, se evaluó el seguimiento de cada paciente en cada

una de las fases del estudio utilizando el criterio ya descrito en el que se calificaba 1 al mal seguimiento, 2 al seguimiento irregular y 3 al buen seguimiento.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Fase	2	188,6	94,31	4,19	0,017
Error	114	2563,8	22,49		
Total	116	2752,4			

Medias

Fase	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	41	10,92	6,94	(9,45; 12,38)
2	40	8,242	3,331	(6,757; 9,728)
3	36	8,268	2,418	(6,703; 9,834)

Desv.Est. agrupada = 4,74234

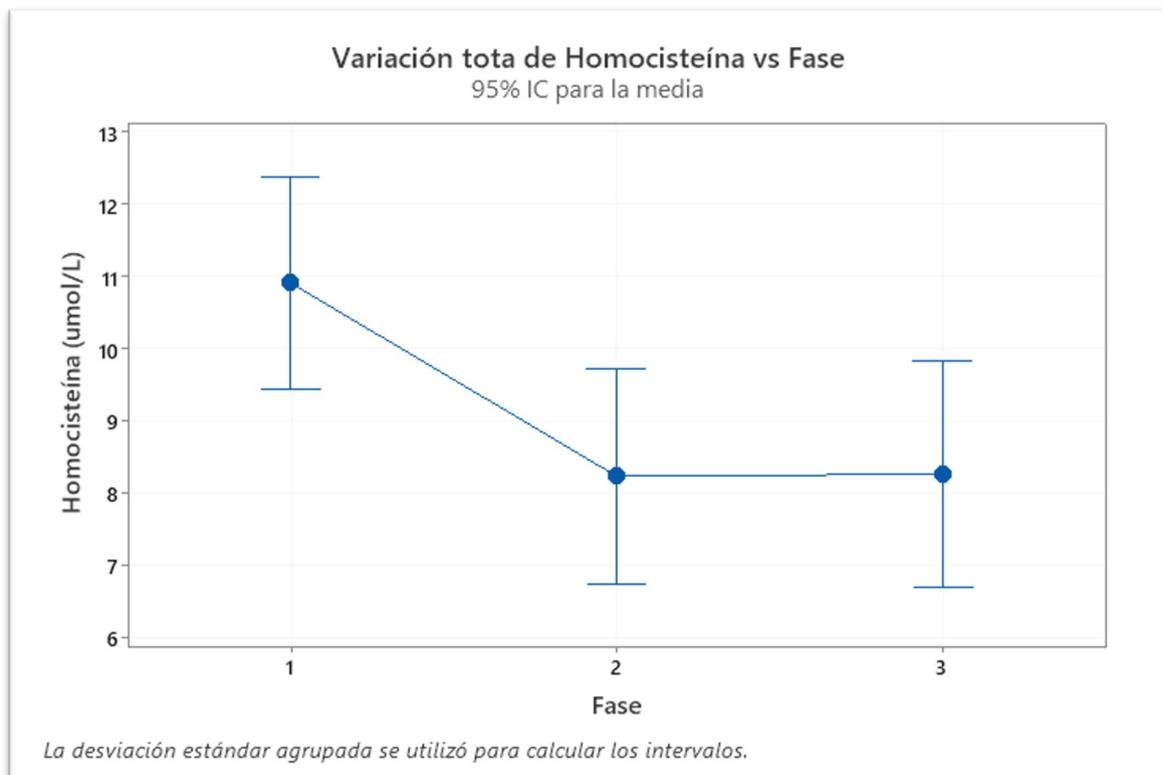


Figura 39: ANOVA y representación gráfica de valores de homocisteína en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

El grado de adherencia a la dieta se resintió a lo largo de los meses, pasando de una media de 2 en el segundo punto de control, es decir, a los 6 meses, a una puntuación inferior a 1,6 en el tercero y último punto de control, es decir, al año (Figura 40).

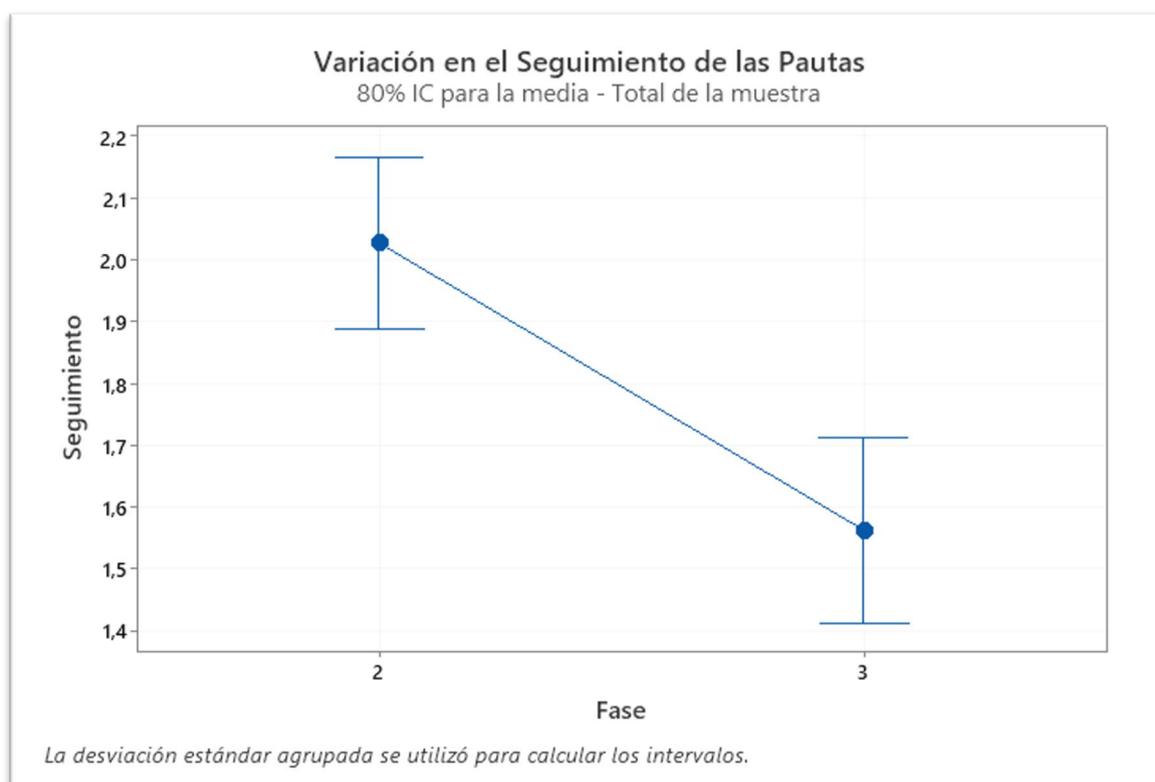


Figura 40: Representación gráfica de la calificación de seguimiento o adherencia a las pautas dietéticas en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de valoración, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento. La evaluación del seguimiento se puntuó de 1 a 3, siendo 1 poca adherencia, 2 adherencia irregular en el tiempo y 3 buena adherencia mantenida en el tiempo.

Dado que no todos los pacientes hicieron un buen seguimiento de la dieta propuesta, se decidió separarlos en función de su adherencia a las pautas nutricionales. En la figura 41 se muestra la variación de la homocisteína en función del seguimiento de la dieta por parte de los pacientes. El grupo 1 corresponde a los pacientes que realizaron un peor seguimiento, el grupo 2 son los pacientes con un seguimiento irregular y el grupo 3 son los pacientes con una buena adherencia a las pautas. El grupo de pacientes que mejor seguía las pautas nutricionales prescritas, es decir, el grupo 1, mostraban una reducción

del nivel de homocisteína considerablemente mayor que los pacientes incluidos en el grupo 2 o los del grupo 3. Estos dos últimos grupos de pacientes presentan una reducción media menor a 2 $\mu\text{mol/L}$ mientras que la reducción media del grupo de buenos seguidores es mayor de 6 $\mu\text{mol/dL}$, es decir, más del triple que en los otros grupos.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Seguimiento 1/2	2	204,0	101,99	2,50	0,097
Error	34	1384,9	40,73		
Total	36	1588,9			

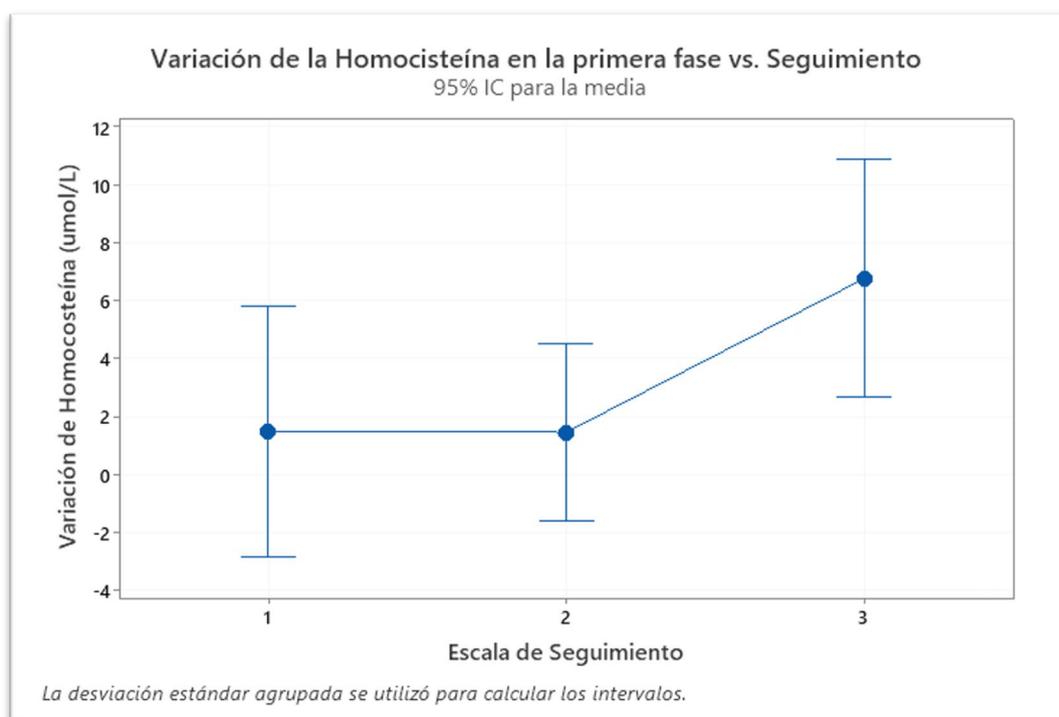


Figura 41: ANOVA y representación gráfica de intervalos de variación de los valores de homocisteína frente al seguimiento en la primera fase del estudio. El eje Y representa la reducción media de los niveles de homocisteína en los pacientes a los 6 meses del inicio del tratamiento nutricional. El eje X representa los tres grupos de pacientes en que se les ha clasificado en función de su adherencia a las pautas nutricionales, siendo 1 el grupo de pacientes con peor seguimiento, 2 el grupo de pacientes con seguimiento irregular, y 3 los pacientes con buena adherencia a las pautas.

4.3.3. Variación total de los niveles de glucosa

Cuando se analizaron los niveles de glucosa a lo largo del estudio se observó que hay una tendencia de aumento de los valores de glucosa respecto a los valores iniciales. Detectando una diferencia significativa entre los niveles basales y los niveles al año de estudio. Tal y como se refleja en la figura 42, la variación de la media es menor al 5% y los niveles de glucosa son óptimos al final del estudio por lo que no se considera que sea una variación con relevancia clínica.

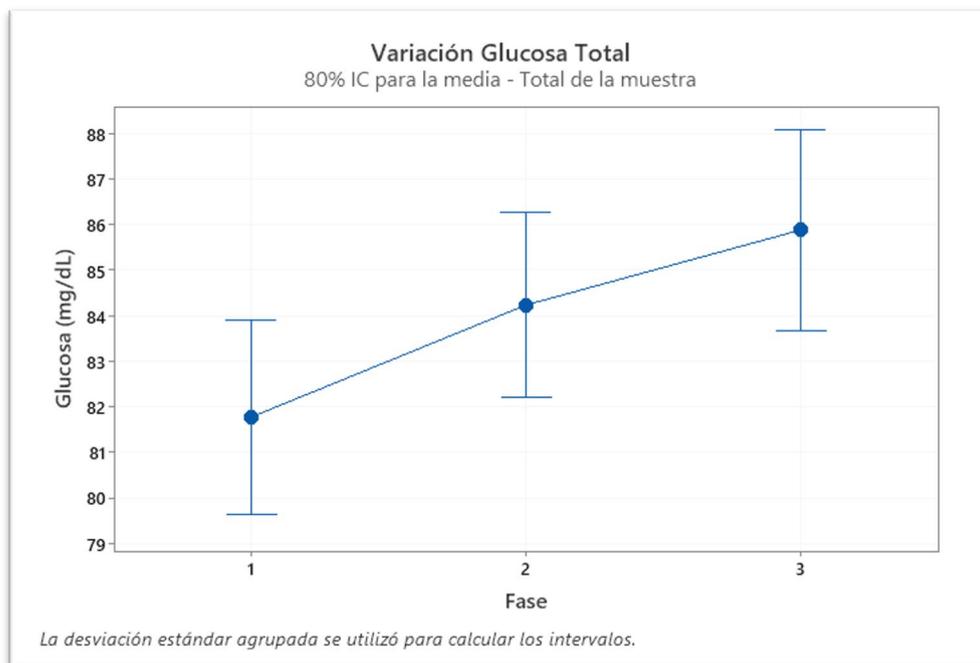


Figura 42: ANOVA y representación gráfica de valores de glucosa en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.4. Variación total de la creatinina

Respecto a la variación de los niveles de creatinina a lo largo del estudio (Figura 43), se apreció una tendencia a la reducción durante los 6 primeros meses de tratamiento nutricional manteniéndose sin variación en los siguientes 6 meses. En los primeros 6 meses la creatinina media baja de 1,04 mg/dL a 0,79 mg/dL, lo que supone una reducción del 24%.

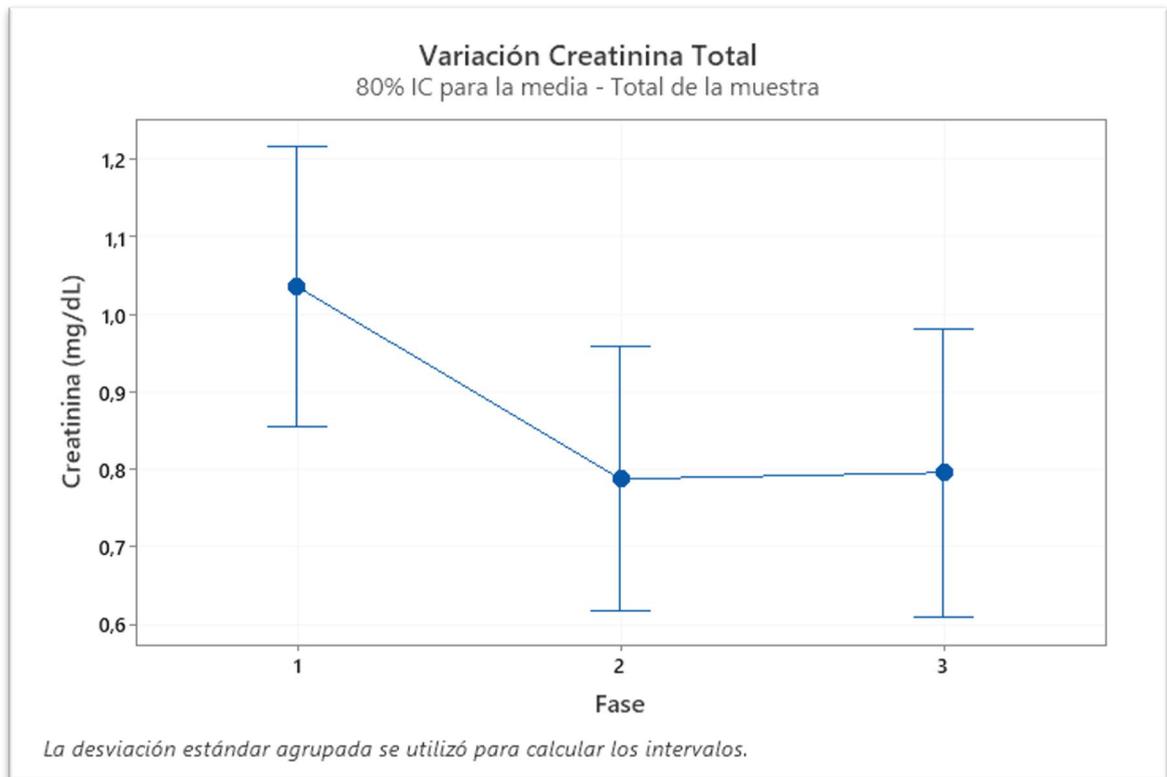


Figura 43: ANOVA y representación gráfica de valores de creatinina en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.5. Variación total del colesterol

No se apreció una variación significativa del colesterol total en la muestra de pacientes a lo largo del estudio (Figura 44), siendo la media basal de 189,2 mg/dL y la media al año de tratamiento de 195 mg/dL. Sin embargo, cuando se estudian por separado las variaciones en colesterol-HDL y colesterol-LDL obtenemos resultados más significativos. Por una parte, se observa un aumento del nivel de colesterol-HDL a lo largo del estudio, que resulta especialmente evidente entre la medida a los 6 meses y al año de tratamiento. Los valores medios de colesterol-HDL son 62,17 mg/dL al inicio, 59,54 mg/dL a los 6 meses (variación esta no significativa) y 67,17 mg/dL al año, lo que supone un aumento del 12,8%. Por otra parte, el colesterol-LDL presenta una evolución opuesta, con una reducción de la media desde los 114,8 mg/dL al inicio del estudio hasta los 108,4 mg/dL al año.

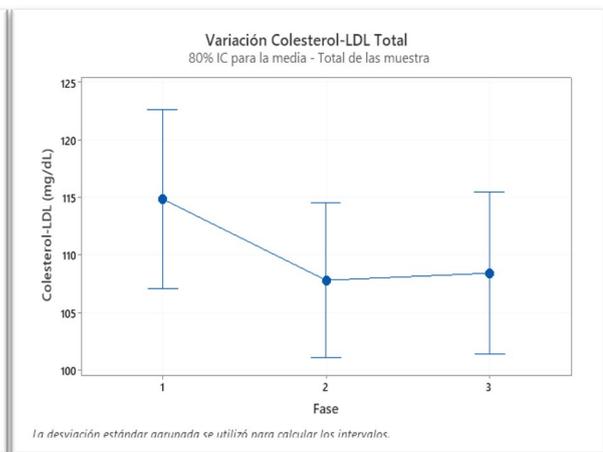
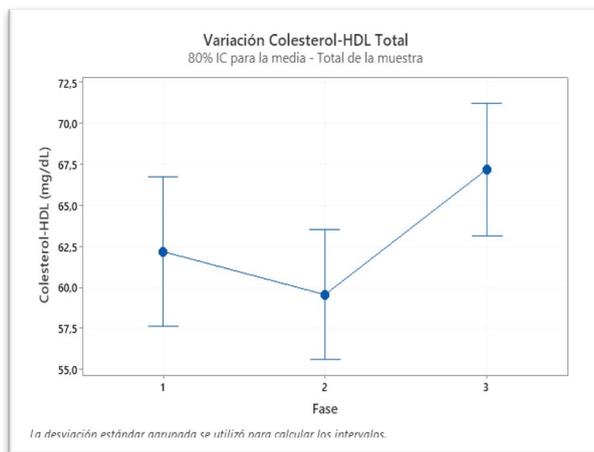
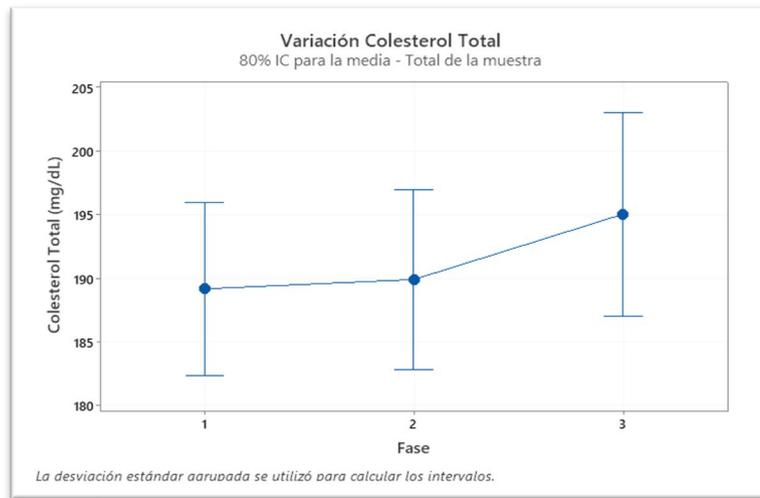


Figura 44: ANOVA y representación gráfica de valores de colesterol total, colesterol-HDL y colesterol-LDL en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.6. Variación de las proteínas totales y de la albúmina

En cuanto a la variación en las proteínas totales y albúmina (Figura 45), no se observaron diferencias en los niveles de proteínas totales a lo largo del estudio. Sin embargo, en cuanto a los niveles de albúmina, aunque la variación no puede considerarse estadísticamente relevante, sí se observa una tendencia hacia valores más bajos.

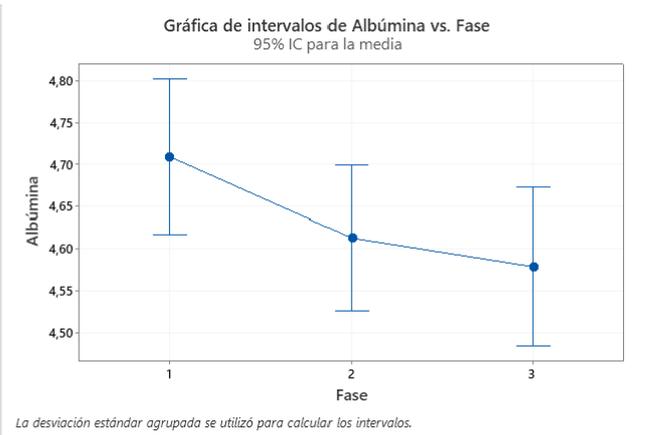
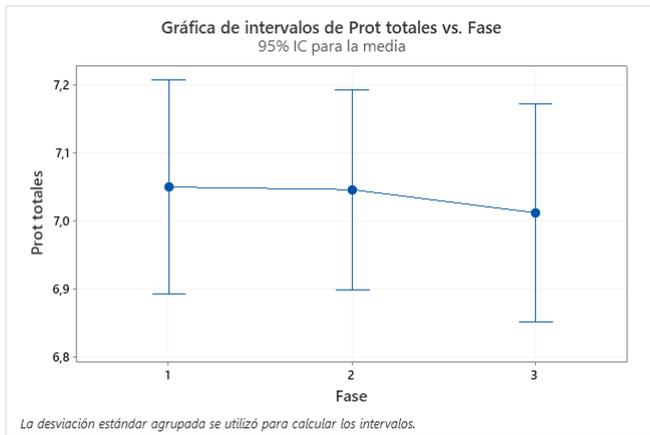


Figura 45: ANOVA y representación gráfica de valores de proteínas totales y albúmina en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.7. Variación de los niveles de hierro, ferritina y transferrina

En relación a los niveles de hierro descritos en la figura 46, se produce un aumento evidente y significativo a lo largo del año de estudio. La principal variación se produce en el primer semestre, pasando de un nivel de hierro medio basal de 78,58 $\mu\text{g/dL}$ a un nivel medio a los 6 meses de 98,9 $\mu\text{g/dL}$, lo que supone un incremento del 25,8%. La tendencia en el segundo semestre es a la baja, pasando a un nivel medio de 87,17 $\mu\text{g/dL}$ al año, aunque sigue suponiendo un aumento neto desde el inicio.

En relación con los niveles de ferritina y transferrina, se mantienen constantes a lo largo del año de estudio (Figura 46). Los niveles medios de ferritina se mueven entre los 139,3 y los 118,1 ng/mL . En el caso de la transferrina, los valores medios a lo largo del estudio oscilan entre los 252,6 y los 257,97 ng/mL . En ambos casos, las desviaciones estándar son demasiado amplias como para sacar conclusiones estadísticamente relevantes.

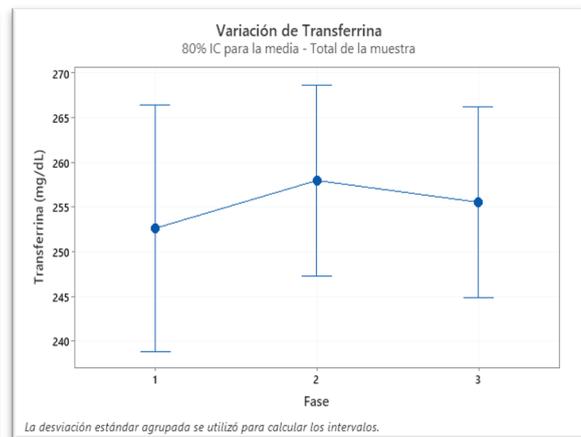
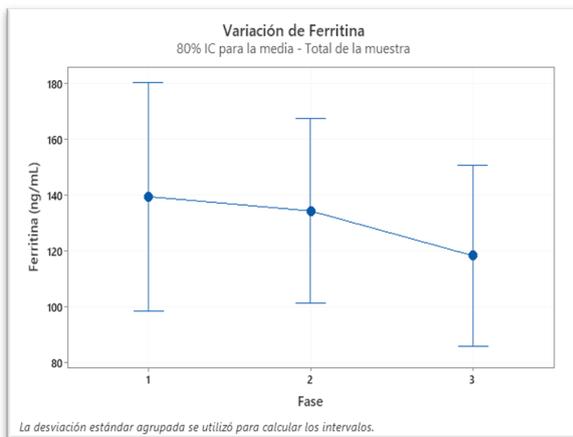
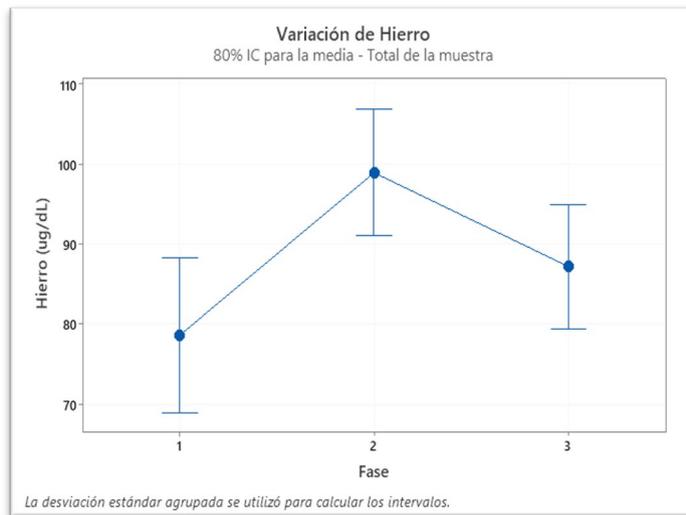


Figura 46: ANOVA y representación gráfica de valores de hierro, ferritina y transferrina en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.8. Variaciones de los niveles de vitamina B12, vitamina D y ácido fólico

En la figura 47 se representan las variaciones de diferentes vitaminas. Los datos obtenidos nos permiten evidenciar un aumento de los niveles de vitamina B12 durante el segundo semestre del estudio, donde el nivel medio se incrementa de los 409,2 a los 539,9 pg/L.

Tanto la vitamina D como el ácido fólico se mantienen constantes a lo largo del año de estudio, con unos niveles entre 27-29 ng/mL en el caso de la vitamina D y niveles medios entre 8 y 8,1 ng/mL para el ácido fólico.

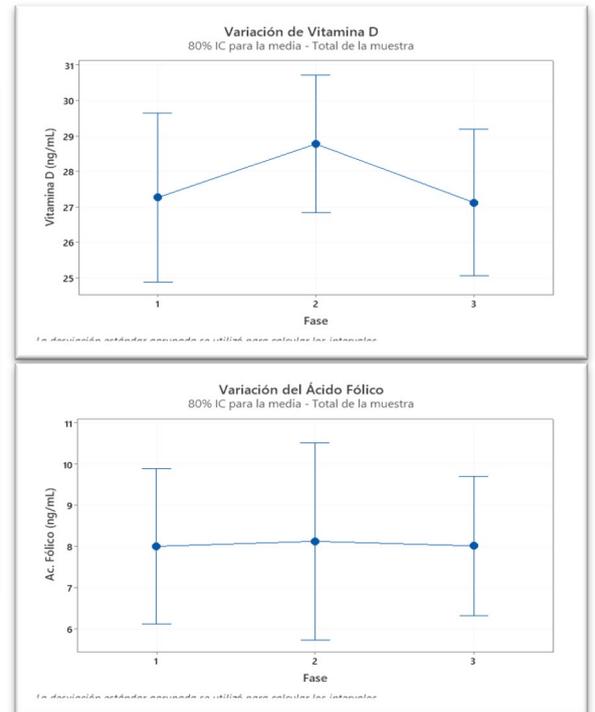
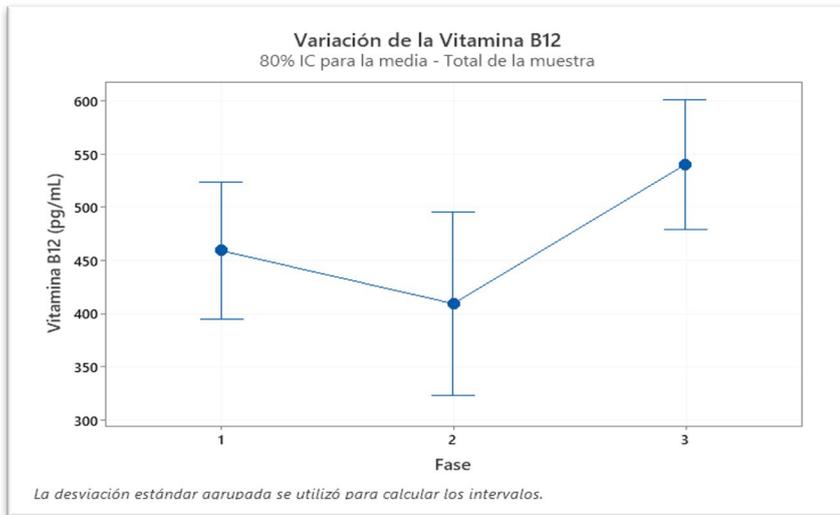


Figura 47: ANOVA y representación gráfica de valores de vitamina B12, vitamina D y ácido fólico en la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.9. Variación de parámetros bioquímicos en función de la línea de tratamiento

Con el objetivo de comprobar si existían variaciones de los parámetros bioquímicos en función de la línea de tratamiento, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes para cada parámetro.

VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA EN CADA LÍNEA DE TRATAMIENTO

Como se ha indicado anteriormente, los niveles de inicio de la homocisteína son mayores en los pacientes que siguen la primera línea de tratamiento (Figura 48). Sin embargo, después del primer semestre de intervención nutricional, tanto los pacientes de primera línea como de segunda línea reducen los niveles más de un 20%, aunque la

reducción es mayor en los pacientes que siguen la primera línea de tratamiento, reduciendo los niveles de homocisteína un 25%.

Al año de tratamiento nutricional, los niveles de homocisteína en ambos grupos de pacientes son similares.

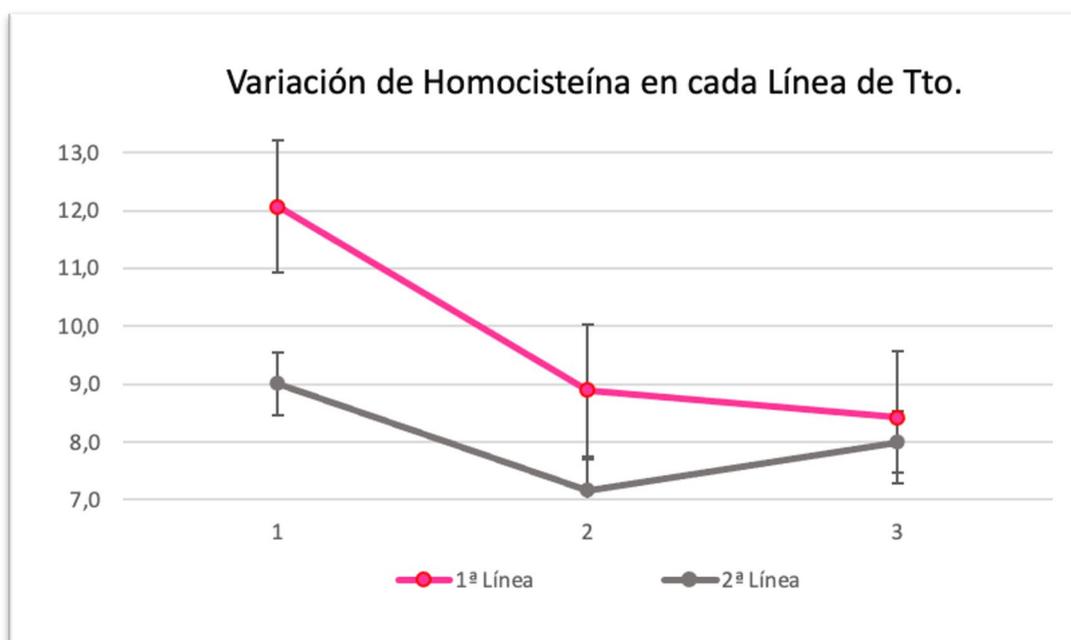


Figura 48: Variación de los niveles de homocisteína (umol/L) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento

VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA, COLESTEROL Y CREATININA EN CADA LÍNEA DE TRATAMIENTO

En el caso de la glucosa, y como veíamos para el total de la muestra (Figura 42), se observa una tendencia general al aumento de la glucosa. Sin embargo, en los pacientes en 1ª línea de tratamiento (Figura 49), se aprecia un aumento más evidente y en los dos puntos de control tras el dato de glucosa basal, mientras que en los pacientes en 2ª línea el aumento es menor y sólo en los primeros 6 meses, manteniéndose el nivel de glucosa estable en los siguientes 6 meses.

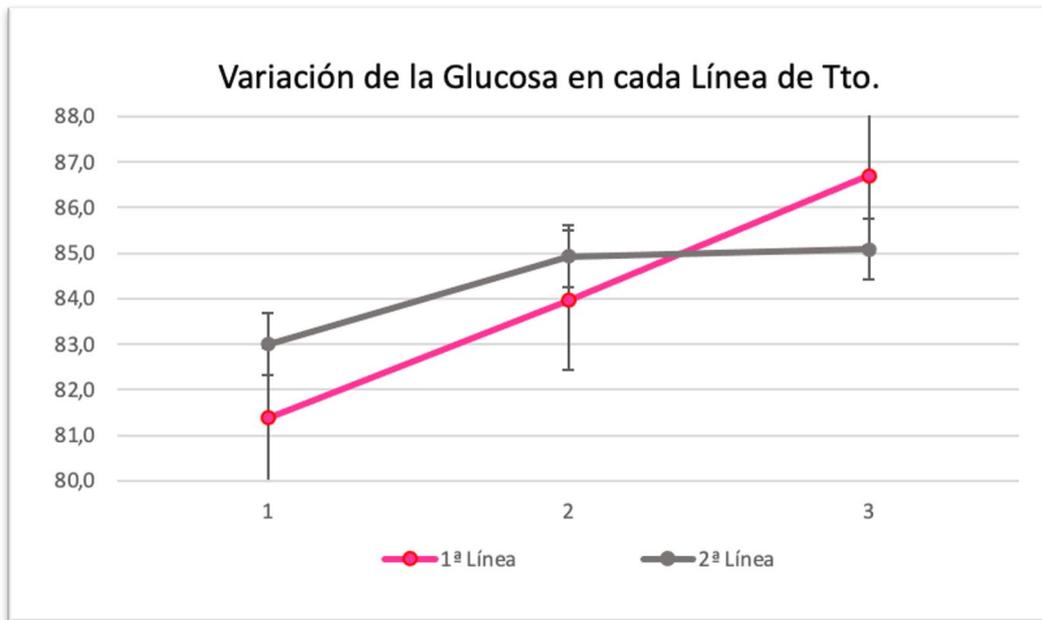


Figura 49: Variación de los niveles de glucosa (mg/dL) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

Los niveles de colesterol total son mayores en pacientes de 2ª línea al inicio y durante los primeros 6 meses de estudio (Figura 50). Sin embargo, al año, los valores de ambos grupos se igualan.

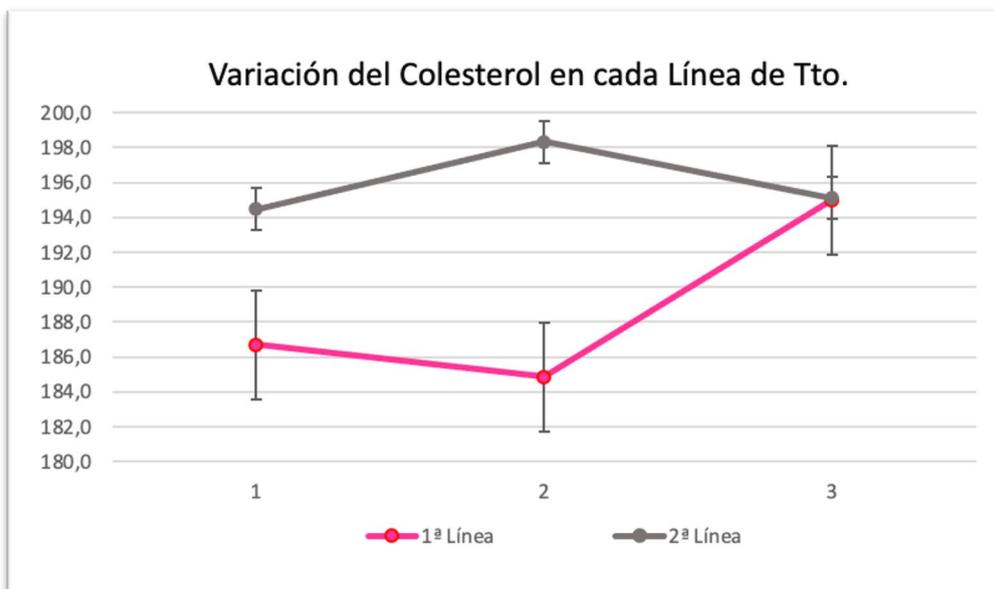


Figura 50: Variación de los niveles de colesterol (mg/dL) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

Los niveles basales de creatinina son mayores entre los pacientes de 2ª línea, pero en este grupo se reducen durante los 6 primeros meses, siendo iguales los valores en ambos grupos de pacientes durante la segunda parte del estudio (Figura 51).

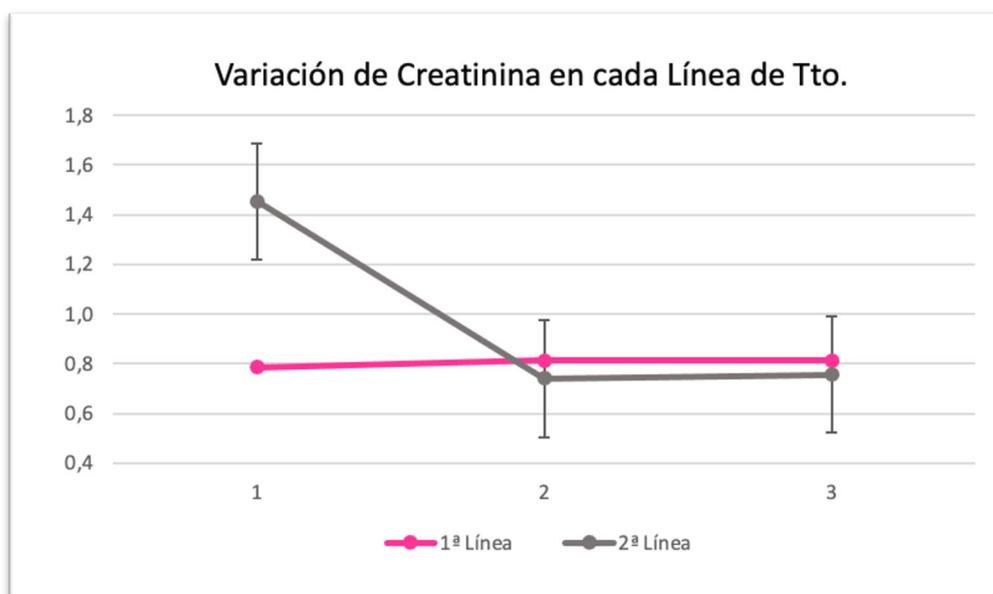


Figura 51: Variación de los niveles de creatinina (mg/dL) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B12, HIERRO Y PROTEÍNAS TOTALES EN CADA LÍNEA DE TRATAMIENTO

La variación de los niveles ácido fólico y la vitamina B₁₂ para cada línea de tratamiento siguen tendencias similares: descenso de niveles en los primeros 6 meses en pacientes de 1ª línea y aumento en los de 2ª línea para terminar convergiendo en valores similares al final del estudio (Figuras 52 y 53).

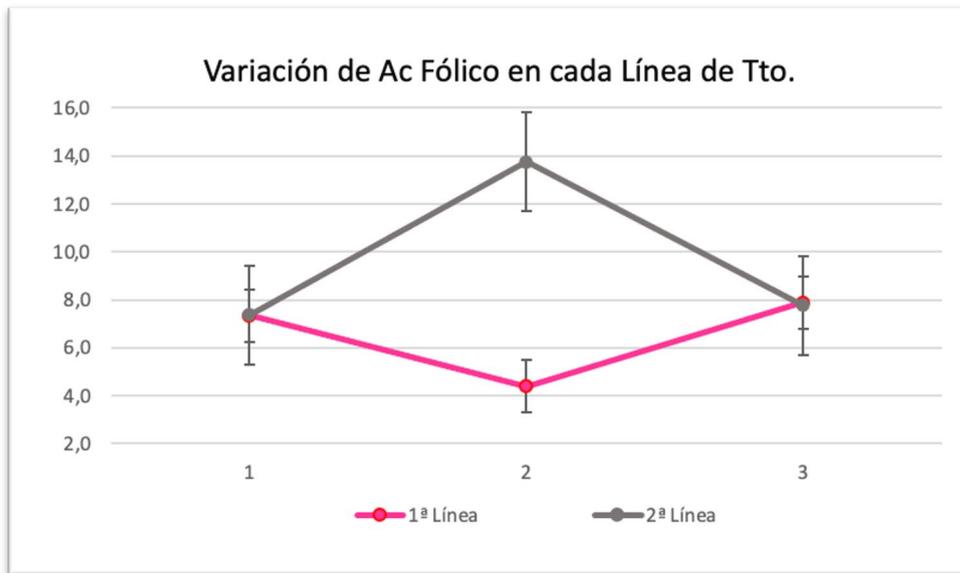


Figura 52: Variación de los niveles de ácido fólico (ng/mL) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

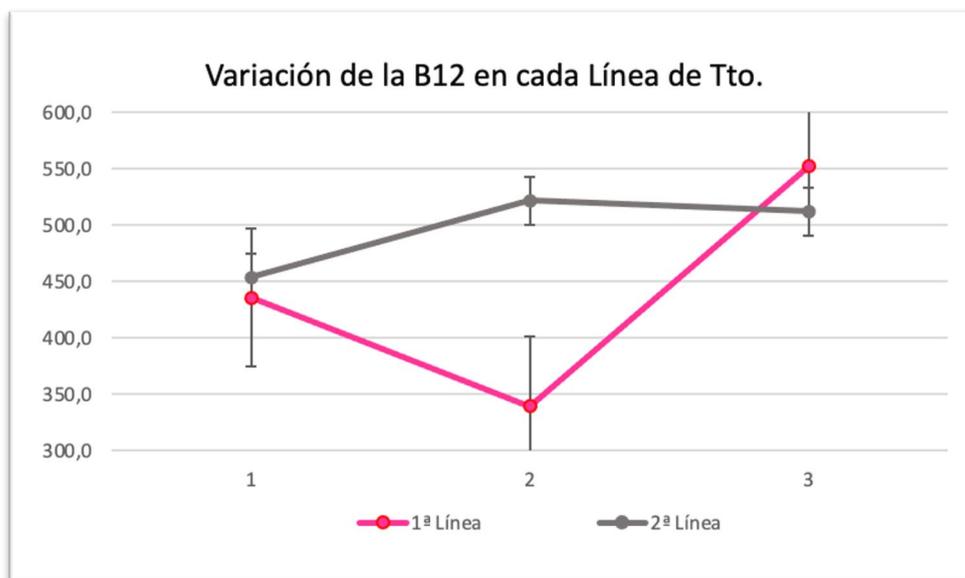


Figura 53: Variación de los niveles de vitamina B12 (pg/mL) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

En el caso de los niveles de hierro, se observa que el aumento de niveles antes descrito para el conjunto de pacientes es debido principalmente por el aumento entre los pacientes de 1ª línea. Sin embargo, como en los parámetros anteriores, los valores se igualan al final del estudio (Figura 54).

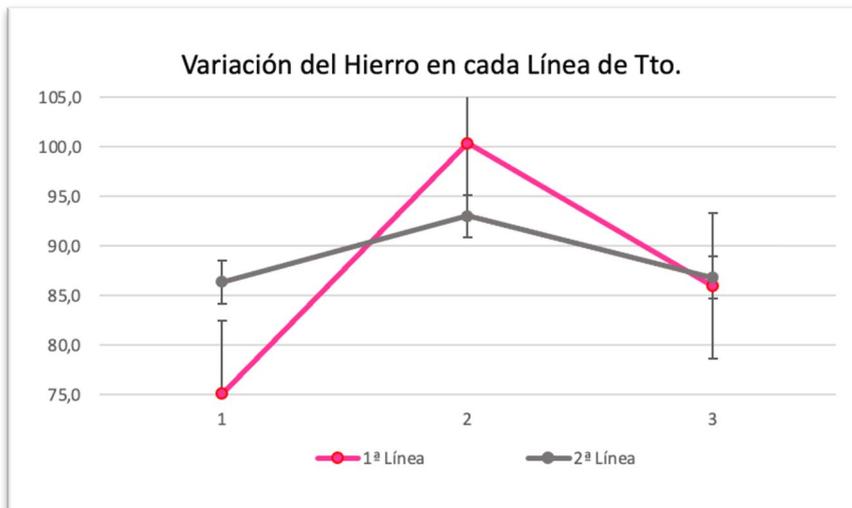


Figura 54: Variación de los niveles de hierro ($\mu\text{g/dL}$) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

En cuanto a los niveles de proteínas totales, se observa una diferencia mantenida durante el año de estudio, con valores siempre mayores entre los pacientes de 1ª línea respecto a los pacientes de 2ª línea (Figura 55).

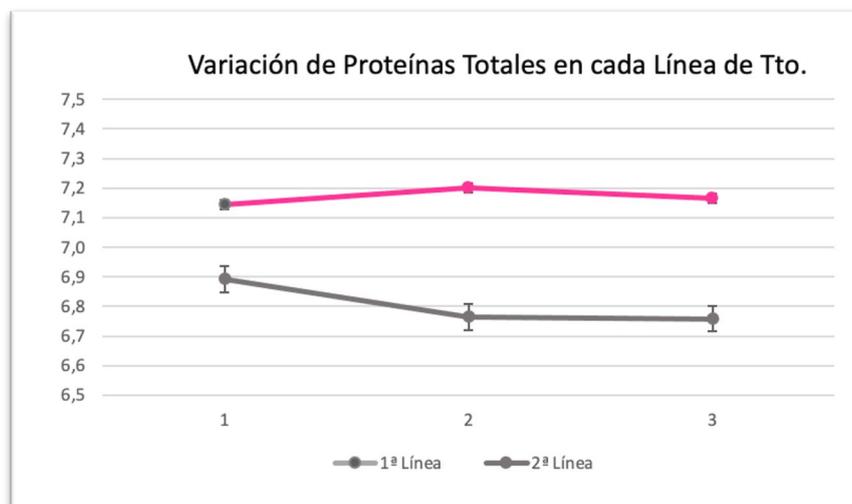


Figura 55: Variación de los niveles de proteínas totales (g/dL) en la muestra de pacientes a lo largo del estudio para cada línea de tratamiento.

4.3.10. Variación de hábitos dietéticos durante el estudio

Así mismo, se ha observado una mejora de los hábitos dietéticos de los pacientes como así lo refleja la puntuación de la escala de frecuencia de consumo de alimentos diseñada para este estudio. Al inicio del estudio la puntuación para el consumo de verdura era de 2,4, que corresponde a un consumo de 2 raciones a la semana, mientras que a los 6 meses esa puntuación sube a 3,3, que corresponde a una ingesta de entre 3 y 5 raciones a la semana (Figura 56).

Aunque la puntuación durante el segundo semestre se mantiene estadísticamente invariante, sí se observa una tendencia a la baja durante ese período, lo que sería un indicativo de que los hábitos dietéticos implementados durante el primer semestre no llegaron a consolidarse en la rutina de los pacientes. En el caso de los alimentos proteicos fuente de proteínas de alto valor biológico, es decir, carne y pescados no procesados y huevos, tan solo se aprecia un ajuste al alza de décimas en la escala de frecuencia, pasando de una puntuación de 3,8 a 3,9. El consumo de alimentos proteicos es elevado en la población española en general, por lo que no cabía esperar un aumento sustancial. Ese aumento de décimas está causado básicamente por la sustitución de carnes procesadas (salchichas, fiambres, hamburguesas industriales) por carnes no procesadas.

La frecuencia de consumo de alimentos no saludables muestra un descenso considerable durante el primer semestre de estudio, pasando de una puntuación de 3,5 a 2,8, es decir, de al menos 3-5 ingestas semanales a máximo de 2 ingestas semanales. Como en el caso de las verduras, pero en este caso a la inversa, también se aprecia una tendencia durante el segundo semestre a volver a los hábitos de partida, aumentando en este segundo período la ingesta de estos alimentos aunque aún lejos de los niveles de inicio.

La evolución en el consumo de verduras y de alimentos no saludables en el segundo semestre, con una tendencia de volver a los hábitos de inicio, puede evidenciarse si observamos la evolución de la puntuación de seguimiento/adherencia a la dieta. Recordemos que esta escala evaluaba el seguimiento de la dieta puntuando 1 a mal seguimiento, 2 a pacientes con seguimiento irregular en el tiempo y 3 a buen seguimiento de la dieta y mantenido en el tiempo. Durante el primer semestre, la

puntuación media fue de 2,03, en zona entre irregular/buena, mientras que en el segundo semestre la puntuación baja a 1,56, en zona entre irregular/mala, es decir, la adherencia a la dieta es significativamente peor durante el segundo semestre (Figura 56).

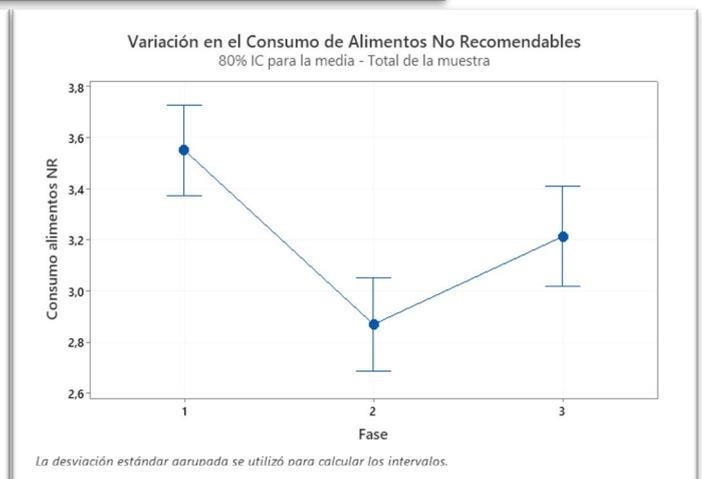
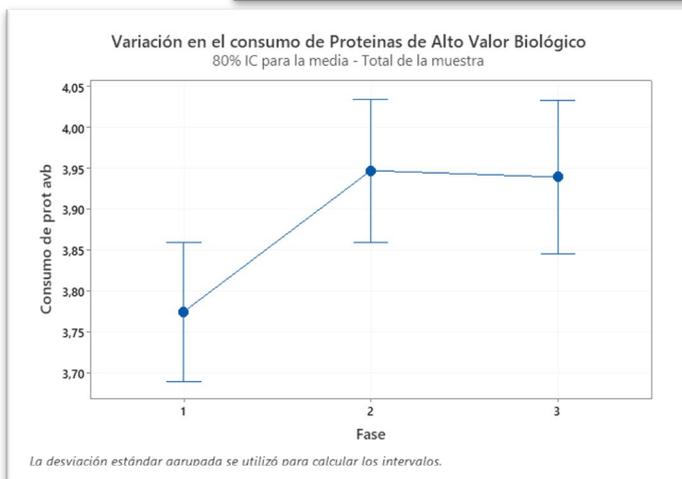
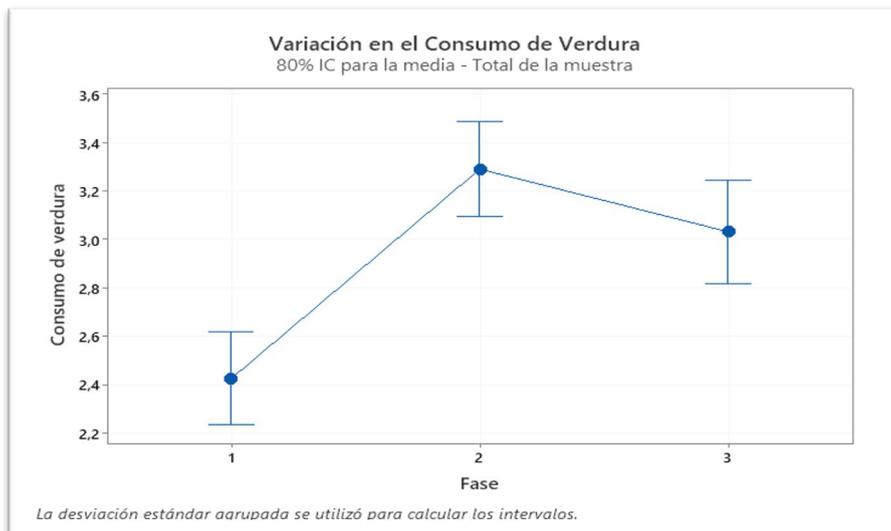


Figura 56: ANOVA y representación gráfica de valores de frecuencia de consumo de alimentos siguiendo la escala creada para este estudio y siendo 1 la frecuencia más baja y 4 la más alta. Los datos corresponden al total de la muestra de pacientes a lo largo del estudio. Las fases indican el momento de toma de la muestra, siendo 1 el valor al inicio (valor basal), 2 a los 6 meses de tratamiento nutricional y 3 a los 12 meses de tratamiento.

4.3.11. Evolución de la EDSS durante el estudio

EVOLUCIÓN GENERAL DE LA EDSS

Aunque se observa un ligero aumento de la EDSS media de los pacientes a lo largo del año de estudio, pasando de 0,96 a 1,13, esta variación no resulta estadísticamente significativa. Ningún paciente que completase el año de seguimiento tuvo brotes de la enfermedad durante ese tiempo (Figura 57).

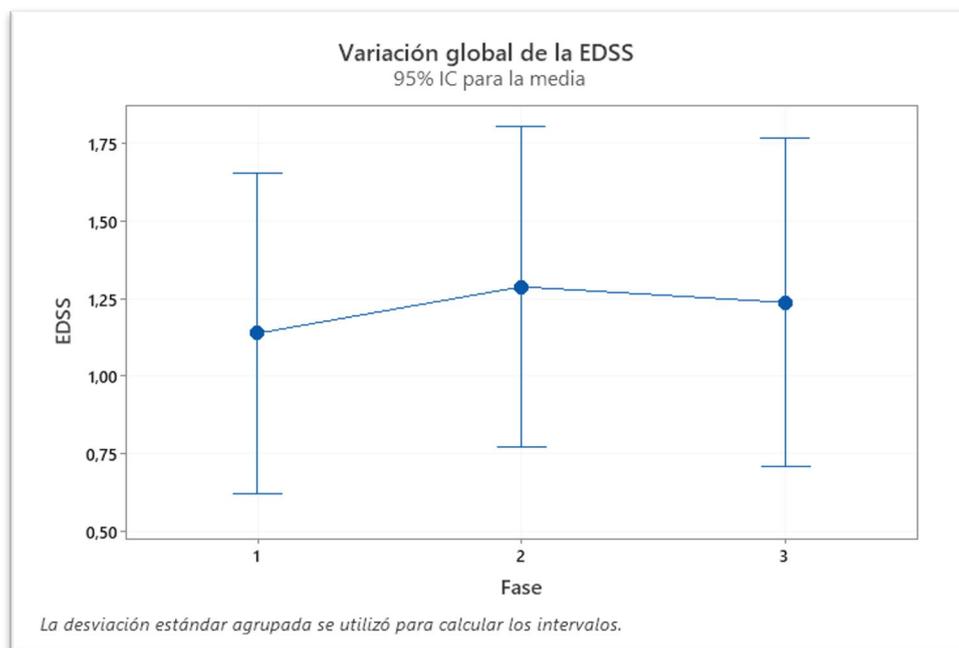


Figura 57: Variación de la EDSS en la muestra de pacientes a lo largo del estudio.

VARIACIÓN DE LA EDSS EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SEGUIMIENTO TOTAL A LO LARGO DEL AÑO DE ESTUDIO

Se estudió el posible efecto del seguimiento de la dieta sobre la evolución de la EDSS a lo largo del año de estudio. Para ello, se consideró el seguimiento individual de cada paciente en cada semestre y se obtuvo el grado de seguimiento total como suma del grado de seguimiento de cada semestre. Los datos muestran una clara diferenciación en la evolución de la enfermedad en función de la adherencia a la dieta, algo que se observa tanto en ambos trimestres por separado como considerando el total del año de estudio.

En las figuras 58, 59, 60 se representa la variación de la EDSS, es decir, si a lo largo del periodo considerado ha habido aumento o disminución en la escala. Así, valores mayores de 0 indican que en ese grupo de pacientes, a lo largo del período considerado, ha habido aumento de la EDSS. Por el contrario, valores menores de 0 indican que esos pacientes han reducido su puntuación en la EDSS durante ese período. La figura 58 representa la variación de la EDSS durante el primer semestre clasificando los pacientes en tres grupos en función de su grado de adherencia a la dieta, siendo 1 una mala adherencia, grado 2 adherencia irregular y 3 una buena adherencia a la dieta. Se observó que el grupo de pacientes con mala adherencia mostraron una mayor puntuación en la escala con un aumento medio mayor a 0,4 en la EDSS a los 6 meses. Sin embargo, en el grupo de pacientes con buena adherencia a la dieta la EDSS reflejó una evolución negativa y la reducción fue en torno al 0,2.

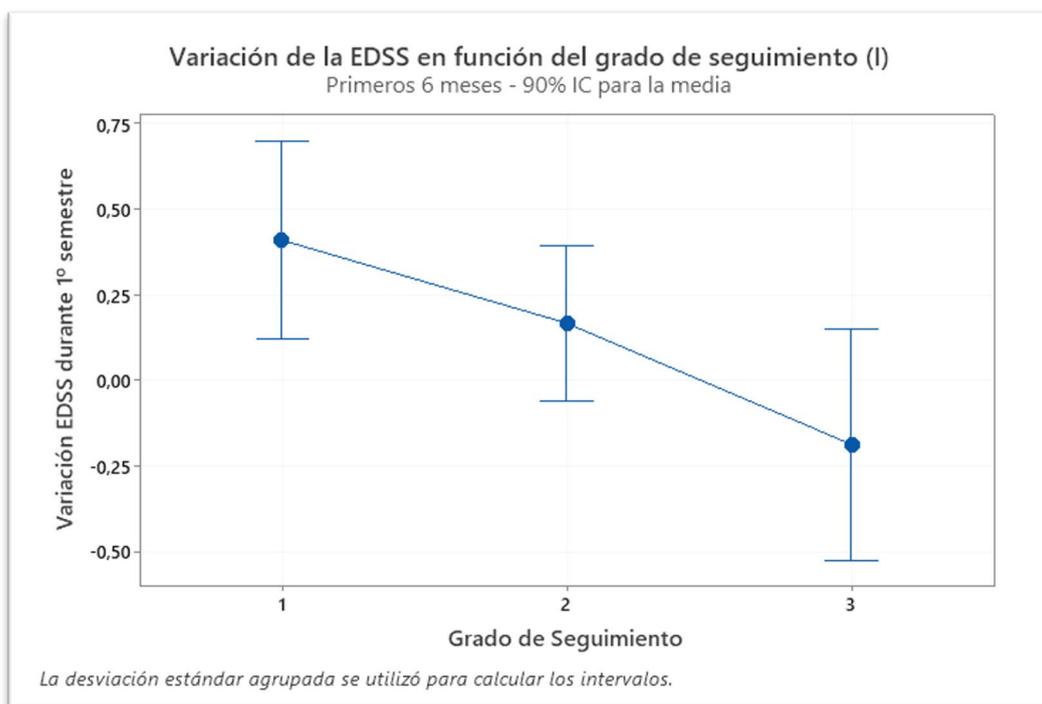


Figura 58: Variación absoluta de la EDSS para cada grupo de pacientes en función del grado de seguimiento de la dieta durante el primer semestre.

Lo mismo que hemos visto para el primer semestre se observó durante el segundo semestre, como se ve en la figura 59. El grupo de pacientes con mala adherencia a la dieta (grado de seguimiento 1) presenta una evolución de la EDSS mayor de 0, con una evolución media de +0,2. Por el contrario, el grupo de pacientes con una buena adherencia a la dieta (grado de seguimiento 3) mostró una variación de la EDSS menor de 0, con una evolución media de -0,7.

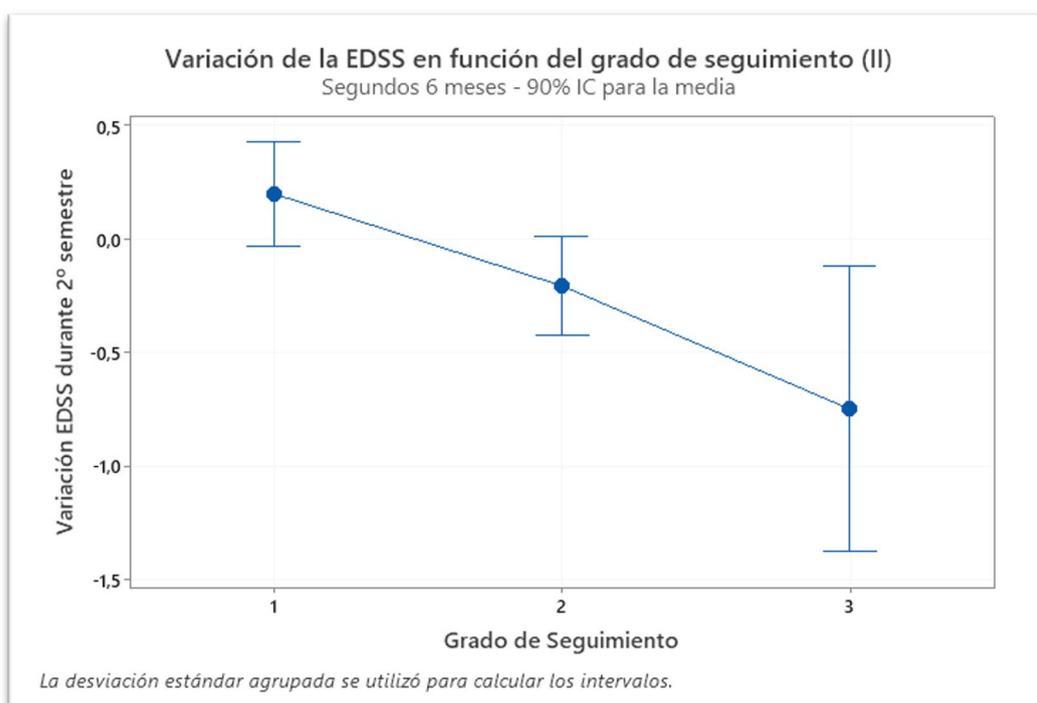


Figura 59: Variación absoluta de la EDSS para cada grupo de pacientes en función del grado de seguimiento de la dieta durante el segundo semestre.

En la figura 60 se muestra la evolución de la EDSS en todo el año de seguimiento. Como el grado de adherencia a la dieta por parte de los pacientes no fue homogéneo a lo largo del año de estudio, con pacientes que empeoraron su adherencia a la dieta a lo largo de los meses, pacientes que la mejoraron con el tiempo y pacientes con un grado de adherencia similar a lo largo del año, se aplicó un grado de seguimiento total que es la suma de los grados de seguimiento de cada semestre para cada paciente. Esto hace que se pudiese clasificar los pacientes en 5 grupos en función de su adherencia a la dieta a lo largo del año de estudio.

La evolución de la EDSS a lo largo del año para cada grupo mostró evidentes diferencias en función del grado de adherencia a la dieta. En un extremo tenemos aquellos pacientes con mala adherencia a la dieta a lo largo de todo el año de estudio (grado de seguimiento total 2) en los que se observó una evolución de la EDSS de +0,65. En el otro extremo, el grupo de pacientes con una buena adherencia a la dieta durante todo el año (grado de seguimiento total 6) en lo que la evolución de la EDSS fue de -1,2.

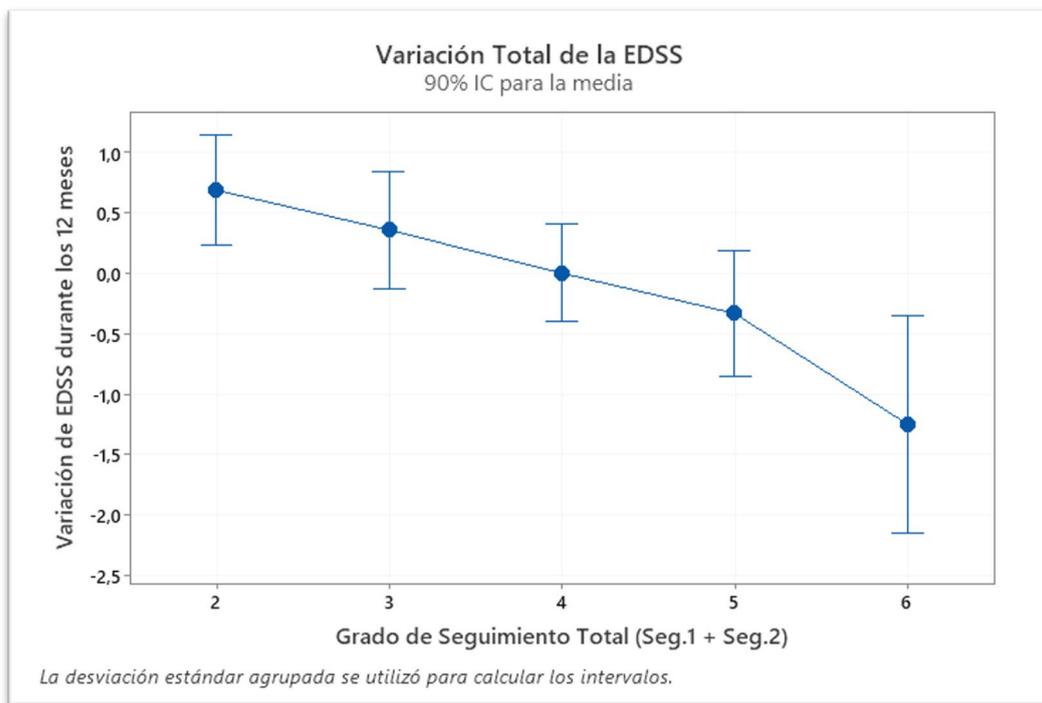


Figura 60: Variación absoluta de la EDSS para cada grupo de pacientes en función del grado de seguimiento de la dieta durante el año de estudio. El grado de seguimiento conjunto de ambos semestres se obtiene sumando el grado de seguimiento de cada semestre para cada paciente.

5. Discusión

5.1. Homocisteína

El estudio realizado en esta Tesis Doctoral muestra dos hechos de especial relevancia que confirman trabajos previos. Por un lado, algo con lo que ya se especulaba como es que los niveles de homocisteína en pacientes con EM son mayores que en población de características semejantes sin enfermedad. Por otro, que los niveles de homocisteína pueden reducirse mediante la dieta en estos pacientes.

En los últimos años son numerosos los trabajos que indican que los niveles de homocisteína son mayores en EM, aunque sigue siendo un punto controvertido. Por ejemplo, el metaanálisis publicado por Dardiotis et al. en 2017 no encontró una diferencia significativa entre pacientes y controles, como tampoco la encontró para vitamina B12 ni para ácido fólico. Por el contrario, un metaanálisis posterior (Li et al. 2020) que analizó 2624 pacientes de 17 estudios sí afirmó que la EM está asociada con mayores niveles de homocisteína. Sin embargo, este estudio también sostenía que no hay diferencias significativas en cuanto a vitamina B12 y ácido fólico entre pacientes y controles.

La posible hiperhomocisteinemia en EM no es un aspecto menor, y varios estudios han examinado el posible mecanismo por el que ésta podría producir neurodegeneración en la EM (Teunissen, 2008; Fahmy, 2018). La hiperhomocisteinemia podría provocar inflamación del sistema nervioso central, interferir con las respuestas de los linfocitos T y B, y reducir los niveles de S-adenosil metionina, que juega un papel importante en la metilación de la proteína básica de mielina. Además, la hiperhomocisteinemia compromete la disponibilidad de metionina, lo que afecta a varias reacciones de metilación. Así, la hipometilación de la proteína básica de mielina supondría la degeneración de la vaina de mielina y se ha observado una peor evolución de la enfermedad en pacientes con hiperhomocisteinemia sobre todo en relación con deterioro cognitivo (Fahmy, 2018). Estos hechos indican que establecer una relación

entre hiperhomocisteinemia y EM sea un asunto de máximo interés para un mejor conocimiento y manejo de la enfermedad.

En nuestro estudio se observa una diferencia significativa de niveles de homocisteína entre pacientes y controles (Figura 30), siendo el nivel medio en pacientes hasta un 45% mayor que en los controles. Sin embargo, y como sostienen los metaanálisis citados, los niveles de homocisteína no parecen estar relacionados con los niveles de vitamina B12 ni con los de ácido fólico. Se observó que, mediante la intervención dietética, se producía una reducción de los niveles de homocisteína de los pacientes cercana al 25% durante el primer semestre, y que los valores se mantenían constantes durante el segundo semestre. La reducción del nivel de homocisteína por la intervención nutricional junto a la no variación de los niveles de vitamina B12 ni de ácido fólico (Figura 47) hacen suponer, como ya apuntaban estudios anteriores (Li, 2020), que el mecanismo afectado en la EM no es el de la eliminación de la homocisteína sino el de su producción, es decir, habría una mayor producción de homocisteína en la EM, pero no una menor eliminación. Siendo esto así, los factores clave para la reducción de la homocisteína no serían tanto el consumo de alimentos ricos en ácido fólico (como verduras) sino la no ingesta de lo que hemos llamado “alimentos no recomendables”, es decir, alimentos procesados, embutidos, carnes grasas, snacks, alimentos azucarados, bollería, además de la reducción de peso corporal en caso de sobrepeso u obesidad. Los mecanismos por los que los hábitos nutricionales y el exceso de peso corporal suponen un aumento de los niveles de homocisteína podrían estar incrementados en la EM. En cualquier caso, en este estudio se evidencia la necesidad de un correcto soporte nutricional para los pacientes con EM como parte de su tratamiento. También se evidencia la necesidad de corregir el límite máximo que se utiliza actualmente (15 $\mu\text{mol/L}$), reduciéndolo a 10-11 $\mu\text{mol/L}$, valor que podría usarse como criterio diagnóstico y como punto a partir del cual establecer terapia nutricional específica y personalizada.

5.2. Colesterol

En el estudio publicado por Durfinová M. et al 2018 se muestran altos niveles de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos en formas progresivas de EM, pero no así en remitente-recurrente (EMRR), la forma de EM que presentan la práctica totalidad de pacientes de nuestro estudio. Sin embargo, en ese mismo estudio se indica que la EDSS correlaciona con el colesterol total en pacientes EMRR y que el aumento de la discapacidad está relacionado con mayores niveles de colesterol total y triglicéridos. En nuestro estudio no se observa una reducción del colesterol total a lo largo del año de intervención nutricional (Figura 44), como tampoco se observa, en términos generales, una variación en la EDSS (Figura 57). Sin embargo, sí se observa una leve reducción en la EDSS en el grupo de pacientes que mostraban una mejor adherencia a la dieta. También se observa que, aunque el colesterol total no varíe, hay una evolución favorable del perfil lipídico, con aumento del colesterol-HDL al año de intervención y reducción del colesterol-LDL ya a los 6 meses de intervención nutricional. Tomando estas evidencias en conjunto, podría suponerse que la adherencia a la dieta tiene efectos en ambos sentidos: mejora del perfil lipídico y reducción de la EDSS. Cabría investigar si ambos efectos están relacionados, es decir, si la mejora del perfil lipídico tiene un efecto positivo sobre la evolución del paciente en forma de una menor EDSS. Esto, a su vez, podría estar mediado por la posibilidad de que el colesterol atraviese la barrera hematoencefálica en la EM (Durfinová, 2018).

5.3. Ácido fólico

El reciente metaanálisis de Li X. et al (2020) sostiene lo publicado en estudios anteriores (Kararizou, 2013), esto es, no se aprecian diferencias en los niveles séricos de ácido fólico entre pacientes con EM e individuos sanos. Tampoco se observa un aumento de los niveles de ácido fólico a lo largo del año de estudio, lo que confirmaría la teoría de que los altos niveles de homocisteína observados en los pacientes no vienen dados por una menor eliminación sino por una mayor producción. El objetivo de futuros estudios debería ser, por lo tanto, encontrar los mecanismos por los que se aumenta la

producción de homocisteína en estos pacientes y si ésta es una de las causas o una de las consecuencias de la enfermedad.

Resulta destacable que sí se observan concentraciones mayores de ácido fólico en pacientes con IMC < 30 respecto a pacientes con obesidad, lo que evidencia el hecho de que el consumo de verduras es menor en personas que padecen obesidad.

5.4. Albúmina

La albúmina es la principal proteína que transporta homocisteína en el plasma, por lo que podría influenciar el proceso por el que la homocisteína es perjudicial para el sistema nervioso central. Por un lado, la albúmina podría actuar como transporte introduciendo homocisteína en el sistema nervioso central a través de las filtraciones en la barrera hematoencefálica lo que, potencialmente, empeoraría la patología. Por otro lado, la unión de homocisteína a albúmina y el rápido aclaramiento de albúmina en el sistema nervioso central podría limitar la capacidad potencialmente dañina de la homocisteína (LeVine, 2016).

Teniendo en cuenta que el presente estudio, al realizar una intervención nutricional podría modificar los niveles de albúmina plasmática y el impacto que conllevaría, las analíticas tanto basales como de seguimiento a los 6 meses y al año incluyeron el análisis de albúmina, así como el de proteínas totales (Figura 45). Los datos obtenidos evidencian que la concentración de proteínas totales se mantiene invariable a lo largo del año de intervención dietética. En el caso de la albúmina, aunque no se pueda hablar de variaciones significativas, se observa una ligera tendencia hacia concentraciones de albúmina inferiores. Puede especularse que la dieta, al limitar la ingesta proteica a alimentos no procesados y aumentar la ingesta de verdura, pudiera tener el efecto de reducir ligeramente la albúmina circulante. Este hecho, junto con la reducción misma de la homocisteína por ella transportada, reduciría la capacidad de la homocisteína de dañar el sistema nervioso central y sería un factor a tener en cuenta al evaluar la evolución de la EDSS de los pacientes.

5.5. Evolución de la EDSS

Los datos de EDSS recogidos durante el año de estudio aportan conclusiones importantes. Podemos observar que, en general, la EDSS no se incrementó de forma significativa en la muestra de pacientes, es decir, en el conjunto de pacientes no hubo progresión clínica de la enfermedad (Figura 57). Por otro lado, los datos indican que se produce una ligera, pero significativa reducción de la EDSS en el subgrupo de pacientes que mostraron mayor adherencia a la dieta, mientras que en el subgrupo con peor adherencia sí hubo un incremento en la EDSS media (Figuras 58, 59 y 60). Estos hechos podrían apoyar la hipótesis de que los niveles de homocisteína y su variación muestran cierta correlación con la progresión clínica de la enfermedad.

Hay pocos estudios hasta la fecha que relacionen los niveles de homocisteína y la progresión de la enfermedad. En 2008, Teunissen et al. publicó un ensayo en el que, tras analizar niveles de homocisteína de un grupo numeroso de pacientes frente a varias escalas de discapacidad, afirma que hay una correlación entre homocisteína y deterioro cognitivo en enfermos de EM como, por otro lado, se ha visto en el Alzheimer (Fuso, 2011; Kim, 2014; Zheng, 2014). Sin embargo, ese estudio no encontró una diferencia significativa en niveles de homocisteína entre enfermos de EM y controles, lo que contradice lo observado en nuestro estudio. En cualquier caso, aunque debemos ser cautos en el manejo de estos datos y ponderar las conclusiones que de ellos puedan obtenerse, sí podemos afirmar que el tratamiento nutricional debe ser una parte fundamental en el tratamiento clínico integral de estos pacientes.

5.6. Índice de Masa Corporal y EM

Diversos estudios observacionales sugieren que un IMC elevado en jóvenes adultos está asociado con un mayor riesgo de desarrollar EM. Por ejemplo, en el Nurse's Health study, un IMC > de 30 Kg/m² a los 18 años se asoció con el doble de riesgo de padecer EM (Munger, 2009). El estudio de Lauren Mokry et al. (2016) apunta en la misma dirección y establece que el riesgo de padecer EM es un 41% mayor en población con obesidad (IMC > 30 Kg/m²) que en población con sobrepeso (IMC > 25 Kg/m²). El estudio de Yin

Xu et al. (2020) afirma que IMCs elevados entre los 16 y los 20 años está asociado con mayor riesgo de EM en los años siguientes en hombres. El IMC medio de la población ha aumentado en muchos países occidentales en las últimas décadas (WHO Statistics 2020) lo que coincide con el incremento de la incidencia de la EM. Un IMB elevado tiene muchos efectos fisiológicos, pero el mecanismo por el que el riesgo de EM es mayor no se conoce.

Aunque se pudiera suponer que el sobrepeso y la obesidad son más frecuentes en pacientes con EM, los estudios al respecto no son concluyentes. Así, por ejemplo, Claudia H. Marck et al. (2016) describen una incidencia menor de obesidad en pacientes con EM que en la población en general. Sin embargo, Cambil-Martín et al. (2014) mostraron una prevalencia de sobrepeso y obesidad del 39% de los pacientes, es decir, mayor que la población general. En este mismo estudio se indicó que el 4% de los pacientes disponían de un peso demasiado bajo, inferior a lo observado en la muestra que incluye a todos los pacientes. Todos los estudios coinciden en que los pacientes con obesidad (y en algunos estudios también pacientes con sobrepeso) muestran peores valoraciones en las escalas de discapacidad, tanto a nivel físico como mental. En el reciente estudio de Mahsa Owji et al. (2019) se observa que IMCs elevados correlacionan con peores calificaciones en las escalas de evaluación cognitiva.

Los datos obtenidos en nuestro estudio indican que los pacientes reclutados presentan un IMC medio de 25,6 Kg/m², donde el 50% de los pacientes tenían sobrepeso u obesidad. Es decir, la prevalencia del sobrepeso u obesidad en la muestra es muy superior a la de la población española adulta. Este dato podría apoyar la hipótesis de que un IMC elevado es un factor de riesgo de padecer EM. Sin embargo, en el presente estudio no podemos establecer esta relación, ya que es probable que exista un importante sesgo en el reclutamiento de los pacientes. Aquellos pacientes con sobrepeso se pueden haber decantado más fácilmente a participar en el estudio por el hecho de querer bajar peso.

Otro hecho que llama la atención en la muestra de pacientes de nuestro estudio es el elevado porcentaje de pacientes con IMCs excesivamente bajos. Como vimos en la figura 13, cerca de un 20% de los pacientes presentaba IMC < 20 Kg/m², lo que difiere mucho del 4% observado en el estudio de Cambil-Martín et al. (2014) y de la distribución de

peso de la población española en general. En conjunto, la muestra de pacientes presenta una distribución de IMCs atípica, teniendo el 50% de los pacientes sobrepeso u obesidad y el 20% un peso excesivamente bajo que, como se ha comentado anteriormente, probablemente esté afectada por un cierto sesgo de reclutamiento. Después de la intervención dietética, se observa una ligera reducción del IMC medio del total del grupo de pacientes, reducción media debida a la disminución en el IMC en el grupo de pacientes con sobrepeso u obesidad, en los que la intervención dietética estuvo dirigida también con este propósito.

5.7. Hábitos dietéticos y línea de tratamiento

En el estudio realizado se ha observado unos hábitos nutricionales diferenciados entre pacientes en función la línea de tratamiento farmacológico que tuviesen pauta (Figura 37). En líneas generales podemos afirmar que en los pacientes con tratamiento farmacológico de primera línea se observan unos hábitos dietéticos más saludables que en los de segunda línea. Los pacientes con primera línea muestran un mayor consumo de verduras, de proteínas de alto valor biológico, y un menor consumo de alimentos no saludables. Aunque también se debe ser cauto a la hora de extraer conclusiones, ya que pacientes con hábitos dietéticos más saludables tienden a recurrir a tratamientos de segunda línea con menor frecuencia. Esto podría ser un hallazgo con importantes repercusiones en el tratamiento clínico de los pacientes, por lo que debería ser objeto de estudios específicos con mayores tamaños de muestra.

5.8. Valores analíticos y líneas de tratamiento

Se observaron diferencias significativas en algunos parámetros en función de la línea de tratamiento. Éste es el caso de la homocisteína basal (Figura 48), cuyos valores basales eran significativamente mayores en pacientes con tratamiento de primera línea. La diferencia se reduce a lo largo del año de estudio hasta llegar a valores similares al final, pero la diferencia al inicio es difícil de explicar. Podría especularse con que los

tratamientos de segunda línea afectan también a la reducción de la homocisteína, pero esto es un extremo nunca estudiado y cuyo mecanismo de acción habría que investigar.

Otro parámetro que se ve modificado en función de la línea de tratamiento es la creatinina (Figura 51). En este caso, los pacientes con segunda línea de tratamiento presentan una creatinina al inicio del estudio significativamente mayor a la de los pacientes con primera línea. Como ocurría con la homocisteína, la diferencia desaparece a lo largo de la intervención nutricional y los valores a partir de los seis meses son iguales. En el caso de las proteínas totales (Figura 55), también se observa una mayor concentración en este caso en pacientes con primera línea; en el caso de las proteínas, la diferencia se mantiene a lo largo del año de intervención.

Estos tres parámetros tomados en conjunto sugieren que las diferentes líneas de tratamiento tendrían un efecto sobre el metabolismo proteico. Según esta hipótesis, los tratamientos de primera línea mantendrían unos niveles de proteínas totales en sangre mayores y consecuencia de ello serían los menores niveles de creatinina. Por el contrario, los tratamientos de segunda línea tendrían un efecto de acelerar el metabolismo proteico, reduciendo los niveles de proteínas circulantes, aumentando los niveles de creatinina y manteniendo unos menores niveles de homocisteína por una mayor eliminación de ésta, tal vez por una remetilación más eficiente. Esta hipótesis vendría apoyada también por los diferentes niveles de vitamina B12 (Figura 53) y de ácido fólico (Figura 52) que presentan los pacientes de cada línea de tratamiento a los seis meses de intervención. Cabría esperar que los niveles de ambas vitaminas aumentasen durante la intervención, pero esto solo ocurre con los pacientes con segunda línea mientras que, sorprendentemente, los niveles disminuyen en los pacientes con primera línea. Según la hipótesis expuesta, un metabolismo proteico más eficiente promovido por los tratamientos de segunda línea supondría un aumento neto de los niveles de estas vitaminas debido a la intervención nutricional, y la reducción de la homocisteína, cuyo punto de partida ya era menor, se deba más bien a otros factores dietéticos como la reducción del consumo de alimentos no saludables o la bajada de peso corporal. Los valores de estas vitaminas en pacientes con primera línea sugieren una mayor utilización de estas en la reducción de la homocisteína. Y en ambas líneas, a

partir de los seis meses y cuando los niveles de homocisteína son menores y similares, los niveles de ambas vitaminas se igualan para las dos líneas de tratamiento.

5.9. Evolución de la adherencia a la dieta

Se observó una variación importante en el grado de adherencia a la dieta a lo largo del año de estudio. En la figura 40 se aprecia que la adherencia a la dieta bajó significativamente en el segundo semestre. Esto se vió reflejado en la variación de los hábitos de consumo de alimentos. En la figura 56 se observa que durante los primeros seis meses de estudio el consumo medio de verduras y proteínas de alto valor biológico aumentó significativamente siguiendo las dietas pautadas. En ese periodo también se observó una reducción muy importante en el consumo de alimentos no recomendables. Sin embargo, el consumo de alimentos no saludables aumentó durante el segundo semestre y se observó una tendencia hacia una menor ingesta de verduras, reflejando una menor adherencia al final del estudio. Consideramos que el seguimiento de las conclusiones de este estudio implica nuevas estrategias para que los pacientes mantengan en el tiempo una alimentación saludable de acuerdo a lo expuesto en este estudio. La principal estrategia sería integrar el tratamiento nutricional en el conjunto del tratamiento clínico, de forma que los pacientes percibiesen la nutrición como una parte más del tratamiento y tan importante como el farmacológico.

6. Conclusiones

- Los pacientes con EM presentan unos niveles de homocisteína significativamente mayores que los individuos sanos. Los valores de homocisteína son mayores entre aquellos pacientes que presentan obesidad o sobrepeso.
- En lo referente a la relación entre hábitos dietéticos basales y niveles de homocisteína, los datos recogidos en este estudio no nos permiten hacer afirmaciones concluyentes, aunque sí se observa una tendencia a niveles de homocisteína ligeramente mayores en pacientes con un menor consumo de verduras y un mayor consumo de alimentos no saludables.
- Los niveles de homocisteína pueden reducirse en los pacientes con EM mediante un soporte nutricional adecuado. La reducción de los niveles de homocisteína parece estar más motivada por el no consumo de alimentos no saludables y por la reducción del IMC que por el aumento en el consumo de verduras.
- La reducción de los niveles de homocisteína es más acusada en aquellos pacientes que mejor se adhieren a la dieta y en aquéllos donde ha existido una reducción de peso.
- La reducción de los niveles de homocisteína es paralela a la reducción en los niveles de creatinina a lo largo del estudio. La reducción de la creatinina observada durante el primer semestre es más acusada en los pacientes con tratamiento de segunda línea, ya que en pacientes con tratamiento de primera línea la creatinina se mantiene constante.
- El nivel de homocisteína podría incluirse como criterio diagnóstico de la EM y el nivel máximo de referencia debería estar entre 11-12 $\mu\text{mol/L}$.

- La implementación de una dieta adecuada podría tener un efecto positivo medible sobre la evolución de la enfermedad. Los datos aportados en este estudio sugieren que una buena adherencia a la dieta correlaciona con una leve mejora en la EDSS, con la posible mejora en la calidad de vida de los pacientes que eso conlleva.
- Tras la intervención nutricional, la vitamina B12 parece aumentar a largo plazo, pero no así el ácido fólico. Este resultado sugiere que el mecanismo por el que la homocisteína es mayor en pacientes sea independiente al ciclo de metilación. El resto de parámetros bioquímicos en pacientes con EM aparecen dentro de la normalidad. Sólo se dan cambios significativos en los niveles de hierro (que aumentan) y en los de creatinina (que disminuyen). Se observó también una tendencia hacia un perfil lipídico más favorable. No se observa una variación significativa de los niveles de colesterol total, pero sí una ligera reducción del colesterol-LDL y un ligero aumento del colesterol-HDL.
- Los niveles de ácido fólico y vitamina D se mantuvieron constantes a lo largo del estudio, no observando una variación significativa respecto a los valores basales. Sí se observó un aumento de la vitamina B12 en el segundo semestre de intervención, período en el que no se observa una mayor reducción en la homocisteína. Estos datos sugieren que la reducción de la homocisteína no se debe, al menos como causa principal, al aumento de la ingesta de verduras y alimentos proteicos magros y ricos en proteínas de alto valor biológico.
- Se ha observado que los pacientes con tratamiento de primera línea tuvieron un mayor consumo de verduras y proteínas de alto valor biológico y un menor consumo de alimentos no saludables. Éste es un hecho relevante ya que sugiere la necesidad de evaluar nutricionalmente al paciente en el momento del diagnóstico de la enfermedad para iniciar la intervención nutricional desde el principio y, potencialmente, retrasar en algunos casos el paso a tratamientos de segunda línea.
- Los pacientes con tratamiento de segunda línea presentaron niveles de urato y creatinina superiores a los de primera línea. También se observó un nivel de proteínas totales y de homocisteína ligeramente inferior. Estos datos sugieren que los tratamientos de segunda línea tienen un efecto sobre el metabolismo proteico posiblemente potenciándolo o haciéndolo más eficaz.

- La adherencia a la dieta disminuye con el paso del tiempo, siendo significativamente peor en el segundo semestre. Esto se traduce en una tendencia a un menor consumo medio de verduras y un mayor consumo medio de alimentos no saludables, aunque sin llegar en ninguno de los dos casos a los hábitos previos a la intervención nutricional.

7. Bibliografía

1. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand.* 1960;147:132-147.
2. Adiele RC, Adiele CA. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.005>
3. Aharoni R. The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond. *Autoimmunity Reviews.* 2013;12:543-553.
4. Ahn JJ. Puberty in females enhances the risk of an outcome of multiple sclerosis in children and the development of central nervous system autoimmunity in mice. *Mult Scler.* 2015;21:735-48.
5. Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Draz HM, Agliardi C, Costa AS, Saulle I, Mohammed AK, Biasin M, Clerici M. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Obesity and Inflammation Activity. *PLoS One.* 2014;9(7):e102141.
6. Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One.* 2013;8:e61110.
7. Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol.* 2014 Oct;10(4):281-8. doi: 10.3988/jcn.2014.10.4.281. Epub 2014 Oct 6. Review. Erratum in: *J Clin Neurol.* 2015 Jan;11(1):106.
8. Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol.* 2014 Oct;10(4):281-8. doi: 10.3988/jcn.2014.10.4.281. Epub 2014 Oct 6. Review. Erratum in: *J Clin Neurol.* 2015 Jan;11(1):106.
9. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9:599-612.

10. Ascherio A, Munger KL, White R, Köchert K, Simon KC, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Edan G, Barkhof F, Pleimes D, Radü EW, Sandbrink R, Kappos L, Pohl C. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* 2014;71(3):306-314.
11. Ascherio A, Munger KL, White R, Köchert K, Simon KC, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Edan G, Barkhof F, Pleimes D, Radü EW, Sandbrink R, Kappos L, Pohl C. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* 2014;71(3):306-314.
12. Bates C. Correlates of plasma homocysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of Young People aged 4-14 years, and comparison with the survey of people aged 65 years and over. *Br J Nutr.* 2002;87:71-9.
13. Battino M, Bullón P, Morillo JM. *Inflamación y Nutrición. Master Internacional en Nutrición y Dietética. Universidad Europea Miguel de Cervantes – Funiber 2013.*
14. Beydoun MA, Beydoun HA, Gamaldo AA, Teel A, Zonderman AB, Wang Y. Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2014 Jun 24;14:643. doi: 10.1186/1471-2458-14-643. PubMed PMID: 24962204; PubMed Central PMCID: PMC4099157.
15. Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2000;26:227-32.
16. Bolander-Gouaille C, Bottiglieri T. *Homocysteina, Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders.* Springer-Verlag. 2003. ISBN: 2-287-04393-4.
17. Bressa GM. S-adenosil-methionine (SAME) as antidepressant: meta-analysis of clinical studies. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1994;154:7-14.
18. Burrell AM, Handel AE, Ramagolapan SV, Ebers GC, Morahan JM. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis and the major histocompatibility complex (MHC). *Discov Med.* 2011;11:187:96.
19. Butz LW, du Vigneaud V. The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *J Biol Chem.* 1932;99:135.

20. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851:469-84.
21. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1505S-19S.
22. Cambil-Martín J, Galiano-Castillo N, Muñoz-Hellin E, Diaz-Rodríguez L, Laguarda-Val S, Fernandez-de-Las-Penas C, et al. Influence of body mass index on psychological and functional outcomes in patients with multiple sclerosis: a cross-sectional study. *Nutr Neurosci*. 2014.
23. Cantorna MT. Vitamin D, multiple sclerosis and inflammation bowel disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523:103-106.
24. Chambers JC. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins. *Circulation*. 2000;102:2479-83
25. Chambres JC. Investigation of relationship between oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. *Cir Res*. 2001;89:187-92.
26. Chao MJ. Epigenetics in multiple sclerosis susceptibility: difference in transgenerational risk localizes to the major histocompatibility complex. *Hum Mol Genet*. 2009;18:261-6.
27. Chytrova G, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. *Brain Res*. 2010;1341:32-40.
28. Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia*. 1996;17(2):83-93.
29. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *Journal of Medical Genetics*. 2001;38:285-303.
30. Dam AN, Berg AM, Farraye FA. Environmental influences on the onset and clinical course of Crohn's disease – part 1: An overview of external risk factors. *Gastroenterology & Hepatology*. 2013; 9:711-717.
31. Dardiotis E, Arseniou S, Sokratous M, Tsouris Z, Siokas V, Mentis AF, Michalopoulou A, Andravizou A, Dastamani M, Paterakis K, Bogdanos D, Brotis A. Vitamin B12, folate, and homocysteine levels and multiple sclerosis: A meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2017;17:190-197.

32. De Bree A. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population. *Am J Epidemiol.* 2001;154:150-4.
33. Di Biase A, Salvati S, Di Benedetto R, Attorri L, Martinelli A, Malchiodi F. Eicosapentaenoic acid pre-treatment reduces biochemical changes induced in total brain and myelin of weanling Wistar rats by cuprizone feeding. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2017
34. Di Rocco A, Rogers JD, Brown R, Werner P, Bottiglieri T. S-adenosil-methionine improves depression in patients with Parkinson's disease in an open-label clinical trial. *Mov Disord.* 2000;15(6):1225-1229.
35. Dunmire SK, Grimm JM, Schmeling DO, Balfour Jr HH, Hogquist KA. The incubation period of primary Epstein-Barr virus infection: viral dynamics and immunologic events. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005286.
36. Duquette P. Multiple sclerosis in the adulthood: clinical profile in 125 patients. *J Pediatr.* 1987;111:359-63.
37. Durfinová M, Procházková D, Petrleňicová D, Bystrická Z, Oresanská K, Kurancka L, Líška B. Cholesterol Level Correlate with Disability Score in Patients with Relapsing-Remitting Form of Multiple Sclerosis. *Neuroscience Letters.* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.030>
38. Durfinová M, Procházková L, Petrleňicová Z, Bystrická K, Oresanská K, Kuracka L, Líška B. Cholesterol Level Correlate with Disability Score in Patients with Relapsing-Remitting Form of Multiple Sclerosis. *Neuroscience Letters.* 2018.<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.030>.
39. Ebers GC. Enviromental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7(3):268-77.
40. Esposito S, Bonavita S, Sparaco M, Gallo A, Tedeschi G. The role of diet in multiple sclerosis: A review. *Nutritional Neuroscience.* 2017. DOI:10.1080/1028415X.2017.1303016.
41. Fahmy EM, Elfayoumy NM, Abdelalim AM, Sharaf SA, Ismail RS, Elshebawy. Relation of serum levels of homocysteine, vitamin B12 and folate to cognitive functions in multiple sclerosis patients. *International Journal of Neuroscience.* 2018;128(9):835-841.

42. Farinotti M, Vacchi L, Simi S, Di Pietrantonj C, Brait L, Filippini G. Dietary interventions for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12:CD004192.
43. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem.* 2007;101:507-99.
44. Fernandez O, Fernández VE, Guerrero M. *Esclerosis Múltiple*. 3ª ed. Momento Médico 2011.
45. Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiology of aging.* 2011;32:1192-1195.
46. Ghezzi A. Prospective study of multiple sclerosis with early onset. *Mult Scler.* 2002;8:115-8.
47. Gil Hernandez, A. director. *Tratado de nutrición*. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
48. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:481-514.
49. Guesnet P, Alessandri JM. Docohexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) – Implications for dietary recommendations. *Biochimie.* 2011; 93:7-12.
50. Hayes CE, Spanier JA. Multiple Sclerosis in Women: Vitamin D and Estrogen Synergy for Autoimmune T-Cell Regulation and Demyelinating Disease Prevention. *Nutrition and lifestyle in neurological autoimmune diseases: multiple sclerosis*. Elsevier. 2017;10:81-107.
51. Hayes CE. Vitamin D actions on CD4(+) T cells in autoimmune disease. *Front Immunol.* 2015;6:100.
52. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. High body mass index before age 20 is associated with increase risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler.* 2012;18(9):1334-6.
53. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007. 2007;357:266-81.
54. Jagannath VA, Filippini G, Di Pietrantonj C, Asokan GV, Robak EW, Whamond L, Robinson SA. Vitamin D for the management of multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;9(9):CD008422.

55. Jiang LH, Yan S, Wang J, Liang QY. Oral administration of docosahexaenoic acid activates the GDNF-MAPK-CERB pathway in hippocampus of natural aged rat. *Pharm Biol.* 2013;51:1188-95.
56. Kalarn SP, Watson RR. Effects of B Vitamins in Patients With Multiple Sclerosis. *Nutrition and lifestyle in neurological autoimmune diseases: multiple sclerosis.* Elsevier, 2017;26:261-5.
57. Kararizou E, Paraskevas G, Triantafyllou N, Koutsis G, Evangelopoulos ME, Mandellos D, Sfagos C, Kapaki E. Plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis in the Greek population. *Journal of the Chinese Medical Association.* 2013;76:611-614.
58. Kim H, Kim G, Jang W, Kim SY, Chang N. Association between intake of B vitamins and cognitive function in elderly Koreans with cognitive impairment. *Nutr J.* 2014 Dec 17;13(1):118. doi: 10.1186/1475-2891-13-118. PubMed PMID: 25516359; PubMed Central PMCID: PMC4290102.
59. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature.* 2013;496:518-522.
60. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(2):89-97.
61. Kurtzke JL. Historical and clinical perspectives of the expanded disability status scale. *Neuroepidemiology.* 2008;31(1):1-9.
62. Lalouschek W. The relation between erythrocyte volume and folate levels is influenced by a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene (C677T). *J Investigative Medicine.* 2000;48:14-20.
63. Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O, Guevara-Guzmán R. Epigenetic mechanism in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* Feb 2015;9(58):1-11.
64. Leblhuber F, Walli J, Artner-Dworzak E, Vrecko K, Widner B, Reibnegger G, Fuchs D. Hyperhomocysteinemia in dementia. *J Neural Trasm.* 2000;107(12):1469-74.
65. Lee S, Kwak HB. Effects of interventions on adiponectin and adiponectin receptors. *J Exerc Rehabil.* 2014;10(2):60-68.

66. LeVine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurology*. 2016;16:47.
67. Li X, Yuan J, Han J, Hu W. Serum levels of Homocysteine, Vitamin B12 and Folate in Patients with Multiple Sclerosis: an Updated. *Int J. Med. Sci.* 2020;17(6):751-761. doi:10.7150/ijms.42058.
68. Li X, Yuan J, Han J, Hu W. Serum levels of Homocysteine, Vitamin B12 and Folate in Patients with Multiple Sclerosis: an Updated Meta-Analysis. *Int J Med Sci.* 2020;17(6):751-761.
69. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-11.
70. Magyari M, Koch-Henriksen N, Pflieger CC, Sorensen PS. Reproduction and the risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19:1604-9.
71. Malinow MR. Plasma homocysteine levels and graded risk for myocardial infarction: Findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1996;126:27-34.
72. Marck CH, Neate SL, Taylor KL, Weiland TJ, Jelinek GA. Prevalence of Comorbidities, Overweight and Obesity in an International Sample of People with Multiple Sclerosis and Associations with Modifiable Lifestyle Factors. *PlosOne*. 2016. Doi:10.1371/journal.pone.0148573
73. Margioris AN. Fatty acids and postprandial inflammation. *Current opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2009;12:129-137.
74. Mato JM. S-adenosylmethionine: A control switch that regulates liver function. *FASEB J*. 2002;16:15-26.
75. Matouk CC, Marsen PA. Epigenetic Regulation of Vascular Endothelial Gene Expression. *J Am Heart Ass*. 2008. ahajournals.org/content/102/8/873/F1.expansion.html
76. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*. 2003;26(3):137-146.

77. McLeod JG, Hammond SR, Kurtzke JF. Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: A reassessment.. Risk of MS by age at immigration. *Journal of Neurology*. 2011;258:1140-1149.
78. Miller A, Korem M, Almog R, Yanina G. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2005;93:7.
79. Mirnikjoo B, Brown SE, Kim HF, Marangell LB, Sweatt JD, Weeber EJ. Protein kinase inhibition by omega-3 fatty acids. *J Biol Chem*. 2001;276:10888-1196.
80. Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Smith GD, Richards JB. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *Plos Medicine*. 2016. Doi:10.1371/journal.pmed.1002053
81. Moñux Ducaju G, et al. Genética, epigenética y proteómica de los aneurismas de aorta abdominal. *Angiología*, 2012;64(3):119-125.
82. Morris MS. Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J J Epidemiology*. 2000;15:140-8.
83. Mudd SH. Disorders in transsulfuration. *The metabolic basis of inherited diseases* 6^{ed}. McGraw-Hill. 1989:693-730.
84. Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*. 2009;73:1543-1550.
85. Nashold FE, Spach KM, Spanier JA, Hayes CE. Estrogen controls vitamin D3-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D3 metabolism and receptor expression. *J Immunol*. 2009;183:3672-81.
86. Niculescu MD, Haggarty P. (Ed.). *Nutrition in Epigenetics*. Blackwell Publishing Ltd. 2011; Stover PJ. Chapter 12: Folate, vitamin B
87. Nijst TQ, Wevers RA, Schoonderwaldt HC, Hommes OR, de Haan AF. Vitamin B12 and folate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of neurological patients with special reference to multiple sclerosis and dementia. *J Neurosurg Psuquiatry*. 1990;53:951-4.
88. Nosewothy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343:938-952.

89. Nygard O. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995;274:1526-33.
90. O’Gorman C, Broadley SA. Smoking and multiple sclerosis: evidence for latitudinal and temporal variation. *J Neurol*; 2014;261:1677-83.
91. Obeid R, McCaddon A, Herrmann W. The role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(12):1590-1606.
92. Okada Y, Tsuzuki Y, Ueda T, Hozumi H, Sato S, Hokari R, Kurihara C, Watanabe C, Tomita K, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Trans fatty acids in diets act as a precipitating factor for gut inflammation? *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl:29-32.
93. Ouellet M, Emond V, Chen CT, Julien C, Bourasset F, Oddo S, LaFerla F, Bazinet RP, Calon F. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: an in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int*. 2009;55:476-82.
94. Owji M, Ashraf-Ganjouei A, Sahraian MA, Bidadian M, Ghadiri F, Moghadasi AN. The relationship between cognitive function and body mass index in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2019;32:37-40.
95. Pantano P, Mainero C, Caramia F. Functional brain reorganization in multiple sclerosis: evidence from fMRI studies. *J Neuroimaging*. 2006;16(2):104-14.
96. Papakostas GI, Cassiello CF, Iovieno N. Folates and S-Adenosylmethionine for Major Depressive Disorder. *Can J Psychiatry*. 2012;57(7):406-413.
97. Pawlosky RJ, Bacher J, Salem Jr N. Ethanol consumption alters electroretinograms and depletes neural tissues of docosahexaenoic acid in rhesus monkeys: nutritional consequences of a low n-3 fatty acid diet. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25:1758-65.
98. Penesová A, Dean Z, Kollár B, Havranová A, Imrich R, Vlcek, Rádiková Z. Nutritional Intervention as an Essential Part of Multiple Sclerosis Treatment? *Physiol Res*. 2018;67:521-533.

99. Piccio L, Stark JL, Cross AH. Chronic calorie restriction attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):940-8.
100. Ponsonby AL. Offspring number, pregnancy, and risk of a first clinical demyelinating event: the AusImmune Study. *Neurology.* 2012;78:867-74.
101. Prokhortchouk E, Defossez PA. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(11):2167-73.
102. Ramagolapan SV. Association of smoking with risk of multiple sclerosis: a population-based study. *J Neurol.* 2013;260:1778-81.
103. Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, Ortiz GG, Pacheco-Moises F, Torres-Sanchez ED, Sorto-Gomez TE, Cruz-Ramos JA, Orozco-Aviña G, Celis de la Rosa AJ. Efficacy of fish oil on serum of TNF α , IL-1 β , and IL-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Oxid Med Longev.* 2013;2013:709493.
104. Ramsaransing GS, Fokkema MR, Teelken A, Arutjunyan AV, Koch M, De Keyser. Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:189-192.
105. Rangel Oliveira S, Flauzino T, Sardinha Sabino B, Kallaur AP, Frizon Alfieri D, Kaimen-Maciel DR, Kaminami Morimoto H, Delicato de Almeida ER, Batisti Lozovoy MA, Vissoci Reiche EM, Dichi I, Colado Simao AN. Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis.* 2018. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0224-4>
106. Redondo Robles L, Pintor de la Maza B, Tejada García J, García Vieitez JJ, Fernández Gómez MJ, Barrera Mellado I, Ballesteros Pomar MD. Nutritional profile of multiple sclerosis. *Nutr Hosp.* 2019;36(2):340-349.
107. Reynolds EH, Linnell JC, Faludy JE. Multiple sclerosis associated with vitamin B12 deficiency. *J Neuroimmunol.* 1991;48:808-11.
108. Reynolds EH. Multiple sclerosis and vitamin B12 metabolism. *J Neuroimmunol.* 1992;40(2-3):225-230.
109. Riccio P, Rossano R, Larocca M, Trotta V, Mennella I, Vitaglione P, Ettore M, Graverini A, De Santis A, Di Monte E, Coniglio MG. Anti-inflammatory nutritional intervention in patients with relapsing-remitting and primary-progressive

- multiple sclerosis: A pilot study. *Experimental Biology and Medicine*. 2016;241:620-635.
110. Riccio P, Rossano R. Nutrition Facts in Multiple Sclerosis. *American Society of Neurochemistry*. 2015:1-20.
 111. Riccio P. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends in Food Science and Technology*. 2004;15:458-461.
 112. Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. 2014;1839(8):627-43.
 113. Runmarker B, Andersen O. Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain*. 1995;118(1):253-61.
 114. Rzeczowska PA, Hou H, Wilson MD, Palmert MR. Epigenetics: a new player in the regulation of mammalian puberty. *Neuroendocrinology*. 2014;99:139-55.
 115. Sadovnick AD. Differential effects of genetic susceptibility factors in males and females with multiple sclerosis. *Clin Immunol Orlando, Fla*. 2013;149:170-5.
 116. Sassone-Corsi P. Physiology. When metabolism and epigenetics converge. 2013;339(6116):148-50.
 117. Schmitz G, y Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008;47:147-55.
 118. Schonberg DL, McTigue DM. Iron is essential for oligodendrocyte genesis following intraspinal macrophage activation. *Exp Neurol*. 2009;218(1):64-74.
 119. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1814(1):186-99.
 120. Schwarz S, Leweling H. Multiple sclerosis and nutrition. *Multiple Sclerosis*. 2005;11:24-32.
 121. Sibarov DA, Abushik PA, Giniatullin R, Antonov SM. GluN2A subunit-containing NMDA receptors are the preferential neuronal targets of homocysteine. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:246.
 122. Sloka JS, Pryse-Phillips WE, Stefanelli M. The relation between menarche and the age of first symptoms in a multiple sclerosis cohort. *Mult Scler*. 2006;112:333-9.
 123. Smith AD. Folic acid fortification: the good, the bad and the puzzle of vitamin B12. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:3-5.

124. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Tervaert JWC, Hupperts R, et al. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2009;8(7):621-6.
125. Spanier JA, Nashold FE, Mayne CG, Nelson CD, Hayes CE. Vitamin D and estrogen synergy in Vdr-expressing CD4(+) T cells is essential to induce Helios(+)FoxP3(+) T cells and prevent autoimmune demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 2015;286:48-58.
126. Stoney CM, Engebretson TO. Plasma homocysteine concentrations are positively associated with hostility and anger. *Life Sciences.* 2000;66:2267-75.
127. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403(6765):41-5.
128. Sudgen C. One-carbon metabolism in psychiatric illness. *Nutrition Research Review.* 2006;19:117-136.
129. Suzuki H, Park SJ, Tamura M, Ando S. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mince: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech Ageing Dev.* 1998;101:119-28.
130. Swank RL, Googwin J. Review of MS patient survival on a Swank low saturated fat diet. *Nutrition.* 2003;19(2):161-2.
131. Swank RL, Googwin J. Review of MS patient survival on a Swank low saturated fat diet. *Nutrition.* 2003;19(2):161-2.
132. Teague WE, Fuller NL, Rand RP, Gawrish K. Polyunsaturated lipids in membrane fusion events. *Cell Mol Biol Lett.* 2002;7:262-4.
133. Teunissen CE, Killestein J, Kragt JJ, Polman CH, Dijkstra CD, Blom HJ. Serum homocysteine in relation to clinical progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79:1349-1353.
134. Triantafyllou N, Evangelopoulos ME, Kimiskidis VK, Kararizou E, Boufidou F, Fountoulakis KN, Siamouli M, Nikolaou C, Sfagos C, Vlaikidis N, Vassilopoulos D. Increased plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis and depression. *Annals of General Psychiatry.* 2008;7:17.

135. Wade DT, Young CA, Chaudhuri KR, Davidson DLW. A Randomized placebo controlled exploratory study of vitamin B12, lofepramine, and L-phenylalanine (the "Cari Loder regime") in the treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;73:246-9.
136. Walker M. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:660-4.
137. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2001;2:777-80.
138. WHO and Multiple Sclerosis International Federation. Atlas: multiple sclerosis resources in the world. 2008.
139. Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5:13-22.
140. Xu Y, Hiyoshi A, Brand JS, Smith KA, Bahmanyar S, Alfredsson L, Olsson T, Montgomery S. Higher body mass index at ages 16 to 20 years is associated with increased risk of a multiple sclerosis diagnosis in subsequent adulthood among men. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020; doi:10.1177/1352458520928061
141. Yi P. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylmethionine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biological Chemistry*. 2000;275:29318-23.
142. Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *Journal of Inflammation Research*. 2014;7:69-87.
143. Zheng Z, Wang J, Yi L, Yu H, Kong L, Cui W, Chen H, Wang C. Correlation between behavioural and psychological symptoms of Alzheimer type dementia and plasma homocysteine concentration. *Biomed Res Int*. 2014;2014:383494.
144. Zhou S, Zhang Z, Xu G. Notable epigenetic role of hyperhomocysteinemia in atherogenesis. *Lipids in Health and Disease*. 2014;13:134.
145. Zhu Y, He ZY, Liu HN. Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B12, folate, and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2011;18:933-38.

